11/3/57

PLEASE EXCHANGE

EXD

岡 山 大 学
農 学 部 学 術 報 告

第 9 号

SCIENTIFIC REPORTS
OF THE
FACULTY OF AGRICULTURE
OKAYAMA UNIVERSITY

No. 9

昭 和 3 1 年 9 月
SEPTEMBER 1956

岡山大学農学部発行

PUBLISHED BY THE FACULTY OF AGRICULTURE
OKAYAMA UNIVERSITY, OKAYAMA, JAPAN

Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/scientific-reports-faculty-of-agriculture-okayama-uni_1956-09_31_9

目　　次

米田茂男
繁田充保：岡山県下の土壌の層位別の燐酸の形態及び分布について……………1

和田宏
湯原正高：ラッテ及びモルモットの子宮の *in vitro* 自発運動に対する Relaxin Preparation の抑制効果………11

和田宏
湯原正高：Relaxin の実験的不活性化及び Relaxin の *in vitro* 子宮攣縮抑制に対する Oxytocic な物質の阻害………21

菅井一男
長沢弘：コリデール種緬羊の離乳時と満１才時における Fleece Character 間の関係について………31

池田長守
中村勝：薄荷種子の発芽促進に関する研究　第１報……………………………39

堀慧
田辺昭：Column 分配 Chromatography による直鎖揮発性脂肪酸の定量について……………47

Contents

YONEDA, S. and SHIGETA, S. :
Forms and Distribution of Phosphorus in the Profiles of Soils in Okayama Prefecture. 1

WADA, H. and YUHARA, M. :
Inhibitory Effect of Relaxin Preparation upon Spontaneous Uterine Contractions of the Rat and the Guinea Pig *in vitro*. 11

WADA, H. and YUHARA, M. :
Experimental Inactivation of Relaxin and Disturbances by Oxytocic Substances towads Inhibition of Relaxin upon Uterine Contractions *in vitro*. 21

SUGAI, K. and NAGASAWA, H. :
Relationship between Weanling and Yearling Fleece Characters in the Corriedale Sheep. 31

IKEDA, N. and NAKAMURA, M. :
Effects of Various Treatments on the Germination of Mint Seeds. 39

HORI, S. and TANABE, A. :
Quantitative Estimation of Straight Chain Volatile Fatty Acids by the Column Partition Chromatography. 47

岡山県下の土壌の層位別の燐酸の形態及び分布について

米田茂男・繁田充保*

Forms and Distribution of Phosphorus in the Profiles of Soils in Okayama Prefecture

Shigeo YONEDA and Mitsuyasu SHIGETA

First, procedures for separating the soil phosphorus into fractions with different chemical properties were examined. Some procedures, which are modifications of Bray and Kurtz's, have been developed by the writers for the determination of acid-fluoride-soluble, acid-soluble and organic phosphorus. Secondly, the quantity and distribution of total, available, acid-fluoride-soluble, acid-soluble and organic phosphorus as well as organic carbon were determined for some Okayama soil profiles.

The available phosphorus content of virgin profiles was not great, ranging from trace in the volcanic ash-organic soils to about 10 ppm. in the mineral soils.

Total, available, acid-fluoride-soluble, acid-soluble and organic phosphorus contents were all greater in the surface layers of the matured mineral soils than in the surface layers of the virgin mineral soils, and, particularly, the increases in the amounts of the available, adsorbed and organic phosphorus were most pronounced in the matured sois. It appears that an accumulation of applied phosphates in the surface layer was responsible for this trend.

In the volcanic ash-organic soils, the total phosphorus content of the virgin soils was high and as much as 80 per cent or more of the total phosphorus was in organic combinations. In general, those soils highest in organic matter were also highest in organic phosphorus. The tendency of volcanic ash-organic soils to fix applied phosphates in the form of organic and acid-soluble phosphorus was found and only a very small percentage of the added soluble phosphates was dissolved in the available form. Thus the amounts of the available phosphorus were smaller in the surface layers of the matured organic soils than in the surface layers of the matured mineral soils.

Organic carbon to organic phosphorus ratios for the matured soils were lower than those for the virgin soils and the differences of this ratios between matured soils and virgin soils were greater in the mineral soils than in the organic soils.

I 緒　　　言

土壌燐酸の形態は無機燐化合物と有機燐化合物に2大別され，その各々の含量及び化合形態は土壌を異にする場合は勿論，層位間にも大差がある．土壌中の無機燐化合物については従来，各

* 前岡大農学部，現岡山農試講習所

種の試薬に対する溶解度の差によつてその形態を間接的に判定する方法が主として採用され，この方法はとくに可吸態燐酸の検定法と関連して多数の方法が提案されている．又近年に至り有機燐化合物が土壌燐酸の可なりの部分を占めることが明かにされ，燐酸経済と関連して有機燐化合物の行動が次第に重要視されるに至つた．筆者等は若干の性状を異にする岡山県下の土壌を供試して土壌燐酸の分別定量法を検討する一方，各層位別にその形態及び分布を解明し，土壌診断の一基礎資料たらしめんとした．

II 供試土壌

本実験においては供試土壌として次の4群の土壌を用いた．尚この他に干拓地土壌を対象として，とくに土壌燐酸の質的変化に及ぼす土壌生成過程の影響を究明したが，その成績は別に報告する．

1　急傾斜地土壌

岡山県下の花崗岩に由来する急傾斜地土壌の例として玉野市背後の丘陵地土壌4種，邑久郡牛窓町の傾斜地土壌4種，児島郡琴浦町仙随開拓地の土壌6種を供試した．

2　果樹園土壌

岡山県南部の果樹園土壌の例として浅口郡鴨方町及び里庄町の土壌4種，赤磐郡万富町及び山陽町（旧西山村）の土壌5種，都窪郡妹尾町箕島の土壌2種を供試した．

3　腐植質火山灰土壌

火山灰に由来する，いわゆる“くろぼく”の例として真庭郡八束村及び川上村に跨る蒜山原地区の土壌6種を供試した．別に比較の参考として関東北部の“くろぼく”の例として栃木農試黒磯分場の土壌2種を供試した．

4　老朽化水田土壌

花崗岩質沖積土に由来する老朽化水田土壌の例として吉備郡久代村の土壌1種を供試した．

以上4群の土壌の概況を示せば次の通りである．

土壌番号	採取地	地目	地質系統	備考
急傾斜地土壌				
2501	玉野市	草生地	花崗岩	未侵蝕地
2504	〃	植林地	〃	樹木の生育　良好；侵蝕地
2505	〃	〃	〃	〃　不良；〃
2506	〃	〃	〃	〃　良好；〃
3301	牛窓町	笹地	花崗岩	未侵蝕地
3302	〃	蜜柑園	〃	侵蝕地
3303	〃	畑地	〃	緩斜面
3304	〃	〃	〃	急斜面
4301	琴浦町仙随	畑地	花崗岩	熟畑地
4302	〃	草生地	〃	未墾地
4303	〃	〃	〃	〃
4304	〃	畑地	〃	開墾5年目
4305	〃	〃	〃	〃　4年目
4306	〃	〃	〃	〃　〃

果樹園土壌

2101	里庄町	桃園	花崗岩	緩斜面
2102	鴨方町	〃	〃	微斜面
2103	〃	〃	〃	急斜面
2104	〃	〃	〃	緩斜面
2105	山陽町	〃	〃	急斜面，開園直後
2106	〃	〃	古生層	急斜面
2107	〃	〃	〃	平坦地の運積土
2108	万富町	〃	沖積土	吉井川堤防沿いの平坦地
2109	〃	〃	洪積層	微斜面
2110	妹尾町	〃	花崗岩	緩斜面
2111	〃	〃	〃	急斜面

腐植質火山灰土壌（くろぼく）

2302	蒜山原	草生地	洪積層	緩斜面，未墾地
2304	〃	畑地	〃	開墾2年目
2310	〃	水田	〃	熟田
2311	〃	草生地	〃	低湿地の未墾地
2318	〃	畑地	〃	開墾3年目
2320	〃	畑地	〃	開墾6年目
4307	栃木県黒磯町	畑地	〃	無燐酸区，5年目
4308	〃	〃	〃	燐酸単用区，5年目

老朽化水田土壌

4201	久代村	水田	沖積層	秋落地

Ⅲ 実験方法

本実験においては土壌燐酸を先づ有機態燐酸と無機態燐酸に分ち，次に無機態燐酸について可吸態燐酸，酸性弗化物可溶燐酸（吸収態燐酸），酸可溶燐酸を定量した．又可吸態燐酸としては，之を吸収態と酸可溶態とに分離せず，この両形態の中で極めて容易に溶出する部分を求めた．

可吸態燐酸，酸性弗化物可溶燐酸，酸可溶燐酸及び有機態燐酸の定量法の大要は Bray 及び Kurtz[2] の方法に準拠し，之を下記の如く修正して行い，且つ燐酸は Dickman 及び Bray[4] の方法によつて比色定量した．即ち供試液の一定量をネスラー比色管に採り，蒸溜水を加えて正確に 35cc とする．次に塩酸—モリブデン試薬 10cc を加えて十分に混和し，直ちに稀薄塩化錫溶液 5cc を注加し，十分に混和して比色した．比色は濾光板 S66 で Pulfrich Photometer を用いて行い，液槽は長さ 20mm のものを用いた．

但し全燐酸のみは A.O.A.C の硝酸マグネシウム法[5] を採用し，濾過棒法による微量定量法によつて求めた．

1　可吸態燐酸の定量法

Bray 及び Kurtz[2] の提案する可吸態燐酸の検定法 Method 2A に準じて行つた．

試　　薬

a. 弗化アンモニア原液（略N NH_4F）……NH_4F 37g を溶解して 1000cc とする．

b. 0.5N HCl……濃塩酸 20.2cc を 500cc に稀釈する.

c. 可吸態燐酸浸出液……NH_4F (a) 15cc と 0.5N HCl (b) 100cc を蒸溜水 385cc に加える. 本液は NH_4F 0.03N と HCl 0.1N に相当する.

定　量　法

供試土壌 5g に浸出液 35cc (c) を加え, 栓をして 40秒間振盪した後濾過, 濾液の一定量をネスラー比色管に採り, 上記の方法によつて発色せしめて比色する.

2　酸性弗化物可溶(吸収態)燐酸の定量法

Bray 及び Kurtz[2) は吸収態燐酸の定量法として, その可吸態部分の定量法 (Method 1A) とその全量の定量法 (Method 3) の2種を提案しているが, 筆者等は浸出液は Method 1A のそれを用い, 但し浸出液の添加量と浸出時間を増大して吸収態燐酸を定量した. 従つて本定量値は吸収態燐酸と稀酸可溶燐酸の合量を意味する.

試　　薬

(a, b) ……1 と同じ.

d. 酸性弗化物可溶燐酸浸出液…… NH_4F (a) 15cc と 0.5 NHCl (b) 25cc を蒸溜水 460cc に加える. 本液は NH_4F 0.03N と HCl 0.025N に相当する.

定　量　法

供試土壌 1g に浸出液 50cc (d) を加え, 30分間振盪したる後濾過し, 以下1と同様に操作して比色定量する.

3　酸可溶及び弗化物可溶燐酸の合量の定量法

Bray 及び Kurtz[2) は先づ試料を 0.1N HCl にて処理せる後 NH_4F を加えて吸収態燐酸を浸出し, 本浸出液を用いて両形態の燐酸の合量を定量 (Method 4) している. 筆者等は前記浸出液 (c) を用い, 浸出液の添加量と浸出時間は前記(2)の場合と同様に行つて, その合量を定量した. 次に本定量値より酸性弗化物可溶燐酸(2)の値を控除して之を酸可溶燐酸とした.

試　　薬

(a, b, c) ……1と同じ.

定　量　法

供試土壌 1g に浸出液 50cc (c) を加え, 30分間振盪したる後濾過し, 以下1と同様に操作して比色定量する.

4　有機態燐酸の定量法

Bray 及び Kurtz[2) は試料を予め H_2O_2 にて処理して有機物を分解せる後前記 Method 4 にて酸可溶及び吸収態燐酸の合量を定量し, H_2O_2 処理を行わない場合の同定量値との差を以て有機態燐酸とみなしている. 筆者等も H_2O_2 処理を行つた後の前記(3)法による定量値と, H_2O_2 処理前の同定量値との差を求め, 有機態燐酸の値を算出した.

試　　薬

a. ……1と同じ.

f. 硼酸溶液 (約 0.8M) ……約 50g の硼酸を加温せる蒸溜水 1000cc に溶解する.

g. 0.1N HCl……濃塩酸 8.1cc を 1000cc に稀釈する.

h. 燐酸を含まぬ過酸化水素……分析用 30% H_2O_2.

i. 浸出液……N NH_4F (a) 75cc と N HCl 250cc を蒸溜水 175cc に加える. 本液は NH_4F 0.15N と HCl 0.5N に相当する.

定　量　法

供試土壌 1g を 50cc に目盛りを施した大型試験管に採り，30% H_2O_2 15ccと水 10cc を加え十分に混合し，湯煎上にて30分間分解する．次に浸出液 10cc (i) を加えたる後水を加えて 50cc となし，栓を施して30分間振盪し，ブフナー漏斗にて濾過する．濾液の一定量 (5～10cc) を 250cc ビーカーに採り，0.8M 硼酸 (f) 15cc を加え，蒸発乾涸する．更に 0.1N HCl 10cc (g) を加え，再び蒸発乾涸する．残渣を少量の 0.1N HCl にて溶解し，蒸溜水にて 50cc に稀釈し，その一定量 (5～10cc) をとり，前記(3)の方法に準じて燐酸を比色定量する．本定量値より前記(3)の定量値を控除した値を以て有機態燐酸とする．

5　全燐酸の定量法

供試土壌 5g を磁製蒸発皿に採り，Mg $(NO_3)_2$ 溶液 5～7cc にて潤ほし，湯煎上にて蒸発乾涸せる後灼熱して有機物を分解する．冷却後水 10cc，HCl 10cc 及び HNO_3 5cc を添加する．時計皿にて覆い，湯煎上にて2時間処理せる後水を加えて 250cc となし，濾過する．濾液 100cc を磁製蒸発皿に採り，湯煎上にて蒸発乾涸する．少量の HNO_3 (1+4) にて溶解し，再び蒸発乾涸せる後 110～120°C にて1時間加熱する．再び前記 HNO_3 にて溶解，濾過し，濾液と洗液とを合して 100cc とする．本液 10cc をミクロビーカーに採り，濾過棒法による微量定量法にて燐酸を定量する．

Ⅳ 実　験　成　績

1　土壌中の可吸態燐酸について

土壌の種類を異にする場合の可吸態燐酸の含量と反応の関係を示せば Table 1 の通りである．

(1)　急傾斜地の土壌について

玉野市背後の花崗岩に由来する侵蝕甚しき丘陵地土壌についてみるに，侵蝕地の土壌の可吸態P含量は何れも数 ppm. で著るしく少なく，未侵蝕地は 10ppm. で前者に比べて稍々多い．且つこれら土壌は大部分が強酸性である．牛窓地区の侵蝕地土壌においても未耕地では前者と同様にP含量は少ないが，耕地のP含量は可なり多く，施肥の影響が明かに認められる．土壌の反応は概して酸性である．

次に仙随開拓地の土壌を検討するに既墾地と未墾地のP含量に明確な相違が認められる．即ち未墾地土壌のP含量は何れも 6ppm. 以下で前記2地区と大差なく，又之を層位別にみると下層土においてP含量が僅に多い傾向が認められる．之に対して開墾地土壌のP含量は 90～874ppm. の範囲を示し，土壌改良剤として施用せる熔成燐肥の効果が明かに示されている．而して当地区で最も熟畑化の進んだ 4301 試料についても表土が多量の可吸態Pを含むに対し，15cm 以下の下層土のP含量は未墾地と大差なく，燐酸の固定の大きいこと及び施用燐酸の下層への移動の少いことを示している．土壌の反応をみるに，未墾地土壌は何れも pH 5 内外を示すに対し，既墾地の表土は pH 5.9～6.8 で明かに pH 価は増大しているが，下層土の反応は未墾地と大差を示さない．

(2)　果樹園土壌について

果樹園の表土中の可吸態P含量には大差があるが，2105 及び 2106 試料を除く他の表土については 78～430ppm. で可なり多く，地質，母岩による差異は明かでない．

次に層位別のP含量を比較するに，2102 及び 2107 試料の如く運積土より成り，土層の極めて厚い園地では下層土迄可なりのP含量を示すに対して，2105 及び 2110 試料の如く花崗岩の残積

Table 1 Available phosphorus at various depths in some Okayama soils

Soil No.	Depth (cm)	pH (H_2O)	Available P_2O_5* (ppm)	Texture
Soils of the steep slope land				
2501—1	0—2	4.2	10	Loam
2501—2	2—12	4.4	2	Sandy loam
2501—3	12—22	4.6	1	〃
2504—1	0—12	5.5	5	〃
2505—1	0—12	5.3	1	〃
2506—1	0—5	5.2	2	〃
2506—2	5—20	5.0	1	〃
3301—1	3—23	5.0	1	〃
3302—1	0—13	6.0	20	〃
3303—1	0—20	4.6	146	〃
3304—1	0—15	5.6	79	〃
4301—1	0—15	5.9	874	Loam
4301—2	15—45	4.9	3	〃
4301—3	45—	5.2	14	〃
4302—1	0—9	5.4	2	Sandy loam
4302—2	9—21	5.6	2	Loam
4302—3	21—	5.4	4	〃
4303—1	0—18	5.6	4	Sandy loam
4303—2	18—34	5.1	6	〃
4304—1	0—20	6.4	90	〃
4305—1	0—20	6.2	115	〃
4306—1	0—20	6.8	178	〃
Orchards soils				
2101—1	0—30	5.6	310	Sandy loam
2102—1	0—31	5.6	206	〃
2102—2	31—60	5.8	189	〃
2102—3	60—	5.7	38	〃
2103—1	0—30	5.4	216	〃
2104—1	0—17	4.9	116	Loam
2105—1	0—27	4.9	3	Sandy loam
2105—2	27—65	4.1	2	Loam
2105—3	65—90	4.5	Tr	〃
2106—1	0—25	5.2	1	〃
2107—1	0—42	6.0	228	Loam
2107—2	42—58	6.0	46	〃
2107—3	58—90	5.3	46	Clay
2108—1	0—40	5.8	78	Loam
2109—1	0—24	5.3	409	Clay loam
2110—1	0—16	5.9	236	Sandy loam
2110—2	16—32	6.0	14	〃
2110—3	32—60	5.9	Tr	〃
2110—4	60—	5.4	1	〃
2111—1	0—12	6.3	430	Loam
Volcanic ash-organic soils				
2302—1	0—55	5.5	Tr	Clay loam
2302—2	55—114	5.9	3	〃
2302—3	114—120	5.7	43	Sand
2302—4	120—152	5.7	16	(Pumice)
2302—5	152—	5.6	6	Clay loam
2304—1	0—45	5.1	1	〃
2310—1	0—30	5.6	23	〃
2311—1	0—45	5.6	Tr	〃
2311—2	45—63	5.6	Tr	〃
2318—1	0—27	5.6	1	〃
2318—2	27—39	5.4	Tr	〃
2318—3	39—50	5.2	Tr	〃
2320—1	0—20	6.2	8	〃
2320—2	20—48	5.2	Tr	〃
4307—1	0—20	5.8	3	〃
4308—1	0—20	6.2	21	〃
Degraded paddy rice soils				
4201—1	0—12	5.4	90	Sandy loam
4201—2	12—15	5.5	49	〃
4201—3	15—27	5.4	25	〃
4201—4	27—48	5.8	7	〃
4201—5	48—72	5.6	2	Clay loam

* Acid-soluble and adsorbed phosphorus determined by the method of BRAY and KURTZ

土より成る園地では下層土のP含量は極めて僅少である．尚これら土壌のP含量と反応の間には一定の傾向は存在しない．

(3) 腐植質火山灰土壌について

蒜山原の“くろぼく”についてみるに，未墾地及び開墾初期の黒乃至黒褐色を呈する“くろぼく”層の可吸態P含量は著るしく少なく，その大部分が痕跡量にすぎず，之を層位別にみると，

下層土では若干多い傾向が認められる．而して開墾6年目の2320試料の表土のP含量は 8ppm. で，又古くから開田されている2310試料では23ppm. で，共に未墾地に比べて僅か乍ら増加している．この場合も土壌の反応との間には一定の傾向は認められない．

次に比較の参考として栃木農試黒磯分場の肥料試験地の表土をみるに，無燐酸区のP含量は蒜山原土壌と大差ないが，燐酸施用区では若干の増加を示している．

(4)　老朽化水田土壌について

砂壌土質の秋落田土壌の可吸態P含量を層位別に比較するに，作土には相当多量のPが含まれているに対して鋤床層では約半減し，更に下層に進むにつれてP含量は急に減少している．

2　土壌中の燐酸の形態について

可吸態燐酸の定量に供試した土壌の若干を用いて土壌燐酸を形態別に分別定量した結果は Table 2 に示す通りである．

Table 2　Forms of phosphorus in the profiles of soils in Okayama Prefecture

Soil No.	Depth (cm)	pH (H_2O)	Organic C (%)	Total P_2O_5 (ppm.)	Available P_2O_5 ppm.	Available P_2O_5 % *	Organic P_2O_5 ppm.	Organic P_2O_5 % *	Acid-fluoride-soluble P_2O_5 (ppm.)	Acid-soluble P_2O_5** (ppm.)	Ratio Organic C / Organic P
Soils of the steep slope land											
3301—1	3—23	5.0	1.56	153	1	0.7	79	51.6	15	2	457
3303—1	0—20	4.6	0.64	972	146	15.0	341	35.1	278	52	42
4301—1	0—15	5.9	1.13	1631	874	53.6	413	25.3	780	342	63
4302—1	0—9	5.4	1.69	264	2	0.8	156	59.1	40	4	241
Orchards soils											
2102—1	0—31	5.6	0.51	923	206	22.3	388	36.6	342	45	30
2102—2	31—60	5.8	0.40	1104	189	17.1	500	45.3	376	64	18
2102—3	60—	5.7	0.22	610	38	6.2	195	32.0	53	57	26
2105—1	0—27	4.9	0.40	181	3	1.7	87	48.1	20	12	107
2105—2	27—65	4.1	0.14	151	2	1.3	75	48.7	15	9	43
2105—3	65—90	4.5	0.15	137	Tr	—	68	49.6	11	8	52
2107—1	0—42	6.0	1.93	2587	228	8.8	1411	54.5	332	177	31
2107—2	42—58	6.0	0.88	1697	46	2.7	792	46.7	146	82	25
2107—3	58—90	5.3	0.45	1483	46	3.1	538	36.3	162	76	20
Volcanic ash-organic soils											
2302—1	0—55	5.5	12.84	2570	Tr	—	1905	74.1	15	0	155
2304—1	0—45	5.1	15.81	1928	1	—	1554	80.6	43	3	233
2310—1	0—30	5.6	6.75	2587	23	0.9	1355	52.4	155	235	114
2320—1	0—20	6.2	12.59	2537	8	0.3	2093	82.5	48	9	138
4307—1	0—20	5.8	7.89	1236	3	0.2	720	58.3	82	13	251
4308—1	0—20	6.2	7.45	2208	21	1.0	1443	65.4	82	364	118

* Of total　** (Acid-soluble and fluoride-soluble phosphorus)—(Acid-fluoride-soluble phosphorus)

(1)　鉱質土壌について

急傾斜地土壌及び果樹園土壌の表土のP含量及び形態をみるに，未耕地土壌（3301．4302）及び開園初期の園地（2105）の試料—A群—と熟畑地（3303．4301，2102．2107）の試料—B群—

の間には明確な相違が認められる．即ちA群の全P含量が 153～254ppm. で僅少なるに対してB群は 923～2587ppm. で明かに多く，この傾向は可吸態Pの絶対量及び全Pに対する百分率にも現われている．而して両群間の相違は全P含量に比べて可吸態P含量において一層顕著に示されている．同様の傾向は酸性弗化物可溶P及び酸可溶Pの含量にも認められる．次にこの両形態の絶対量を比較すると1例を除き前者が著しく多く，吸収態Pが酸可溶Pに比べて主要部分を占めていること及び施用燐酸の可なりの部分が吸収態Pの形で存在することが判る．

有機燐についても絶対量はB群が，A群に比べて明かに多いが全Pに対する百分率をみるとA群が約50%以上を示すに対し，B群は1例を除き37%以下で，A群の方が有機燐の占める割合が多い傾向を示している．

有機態Cと有機態Pの比率についてもA群が107以上を示すに対しB群は63以下で明かに差が認められる．

次に果樹園土壌につき層位別の燐酸の量及び質の変化をみるに全Pを含めての各形態のP絶対量は何れもが表土より下層に進むにつれて減少する傾向を示す一方，層位間のPの形態には可吸態Pの含有率は明かに，又吸収態Pのそれが或る程度表土に多く，下層で減少する以外は特記すべき変化を示さない．

(2) 腐植質火山灰土壌について

“くろぼく”の全P含量は未耕地においても可なり多く，蒜山原土壌では未耕地と既耕地の試料間に認むべき差異は存在しないが黒磯土壌では，燐酸区は無燐酸区の倍量近い含量を示している．酸性弗化物可溶Pについては熟畑土壌が未耕地土壌に比べて僅かに増加の傾向を示すに対して酸可溶P含量は顕著に増加している点は注目に価する．

有機燐は各試料共に著るしく多く，全Pに対して52～83%の範囲を示している．本土壌においても有機燐の占める比率が熟畑土壌に比べて未耕地及び開墾初期の土壌で稍々高い傾向が認められる一方，有機態Cと有機態Pの比率も熟畑土壌が稍々低い傾向が認められる．

V　考察及び結論

Bray 及び Kurtz[2)] は可吸態Pとは直接的に作物生育に関与し，且つその量的変化が作物生育及び施用燐酸の感応度に反映する形態のものと規定し，かかる意味において両氏の提案する酸可溶及び吸収態Pの迅速定量法，即ち本実験で筆者等の採用せる可吸態Pの定量法にて求めた値は，施用燐酸に対する感応度と良き相関々係を示し，従つて土壌燐酸の有効度の検定の目安として有意であると述べている．筆者等も本実験において少くとも燐酸肥料の施用の有無及び熟畑化の程度が該法にて求めた可吸態P含量に明かに反映することを知つた．

近年土壌中の燐化合物を吸収態のものと酸に易溶性のものとに分離することが，可吸態Pの形態に関連して注目され，中性の弗化アンモニアは吸収態の燐酸を酸可溶性のものから分離定量するに好適した浸出剤として広く採用されている．川口，福谷両氏[6)] は本定量法を吟味した結果，礬土質土壌においては弗化アンモニアは遊離礬土と結合した燐酸の相当量を錯解離すること，とくに“くろぼく”の如き火山灰土壌では弗化アンモニアは遊離礬土と結合した有機燐を著るしく溶解するところから，この浸出燐を有効態Pの検定に供することは不適当であると報じ，Peech (1948) も鉄及び礬土と結合している燐酸は弗化アンモニアに溶解する可能性があることを指摘している．而して川口，福谷氏等は浸出剤として 0.5 N NH_4F 溶液を用いて実験しているが，本実験の如く 0.03 N NH_4F 溶液を浸出剤に使用する場合は“くろぼく”の如き火山灰土壌に

於ても浸出燐は特に異常な値を示さないことを認めた．Bray 及び Kurtz[2] も全吸収態Pの定量には0.5 N NH_4F 溶液を用いる一方，可吸態Pの浸出には前記の如く 0.03 N NH_4F 溶液を用いている．従つて土壌燐酸の有効度の検定の目的に対しては稀薄溶液が合理的と考える．

土壌燐酸の量及び質が長期に亙る施肥によつて影響をうけることは明白で，とくに燐酸は他の肥料要素に比べて土壌中での固定が大なることから，施用燐酸が土壌中で如何なる形態で固定されるかは重要な問題である．本実験に於ても鉱質土壌及び黒磯の腐植質火山灰土において熟畑土壌の全P含量が明かに増加していることを知つた．Bray 及び Kurtz[2] は pH 6 以下の未処理土においては吸収態Pが pH 価の高い土壌に比べて多いこと，施用せる可溶性Pは吸収態に変化すると報じ，Arnold 及び Schmidt[1] も概して吸収態Pは pH 価の増加と共に減少の傾向を示すと述べている．本実験に於ても酸性鉱質土壌においては未耕地土壌の吸収態Pは酸可溶Pに比べて多いこと及び熟畑土壌においては酸可溶Pに比べて吸収態Pの増加が一層大きく，施用燐酸の多くが吸収態に変化することを認めた．然るに腐植質火山灰土においては燐酸肥料の施用によつて吸収態Pの増加と同程度に，若しくはそれ以上に酸可溶Pの増加が認められた．

Dean[3] は窒素と燐酸の十分量の存在に於ては有機燐の集積を生じると述べているが，本実験においても鉱質土壌の熟畑試料で明かに有機燐の絶対値の増加を認め，施用燐酸の一部が有機燐として固定されることを知つた．但し全Pに対する百分率は熟畑試料はむしろ減少しているが，之は無機燐としての固定量が更に多いことに基ずくと考える．

腐植質火山灰土に属する黒磯土壌では，燐酸区は無燐酸区に比べて全P及び有機態Pの含量は略倍量近くに増加すると同時に酸可溶P含量に著るしい増加を認めた．之に対して吸収態P含量には殆んど変化なく，又可吸態P含量は若干増加する程度に止つた．要するに“くろぼく”に於ては施用燐酸の可なりが有機態に変化する一方，礬土と結合して酸可溶態としても固定され，可吸態として存在する部分は鉱質土壌の場合に比べて著るしく僅少であることが判る．

次に有機態Cと有機態Pの比率を検討するに，鉱質土壌及び腐植質土壌の各々について未耕土の比率は熟畑土に比べて大なる傾向を示すが絶対値には可なりの差があり，鉱質土壌の熟畑土では63以下であるのに対して腐植質土の比率は110以上を示した．且つ鉱質土壌では未耕土と熟畑土の該比率の相違が著るしいのに対して腐植質土では両者間の差は遙に小である．

Ⅵ　摘　　　要

岡山県下に分布する急傾斜地土壌，果樹園土壌，腐植質火山灰土壌及び老朽化水田土壌を供試して土壌燐酸の形態別の分別定量法を検討する一方，その層位別の分布を究明し，次の結果を得た．

1） 可吸態P含量は鉱質土壌及び腐植質火山灰土壌の何れにおいても未耕土は 10ppm. 以下で，とくに“くろぼく”では殆んどが痕跡量にすぎなかつた．然るに熟畑化の進行に伴い可吸態P含量は次第に増加し，とくに施用燐酸の影響が顕著に認められた．

2） 鉱質土壌においては熟畑土壌では全P，酸性弗化物可溶P，酸可溶P及び有機態Pの各含量は何れも未耕土に比べて増加するが，就中吸収態Pと有機態Pの各含量の増加が著るしい．

3） 腐植質火山灰土壌においては未耕土の全P含量も可なり多く，その約80％が有機燐として存在している．且つ“くろぼく”に於ては燐酸肥料の施用により有機燐の増加及び吸収態Pと同程度，又はそれ以上の酸可溶Pの増加を結果する一方可吸態Pの増加は鉱質土壌に比べて遙かに僅少に止る．

4) 有機態Cと有機態Pの比率は，未耕土と熟畑土を比較する場合，前者が後者より大で，且つ該比率の差は鉱質土壌が腐植質火山灰土壌に比べて大である．

引 用 文 献

1) Arnold, C. Y., and Schmidt, W. A. (1951), Soil Sci., 71 : 105—115.
2) Bray, R. H., and Kurtz, L. T. (1945), Soil Sci., 59 : 39—45.
3) Dean, L. A. (1938), Jour. Agr. Sci., 28 : 234—244.
4) Dickman, S. R., and Bray, R. H. (1940), Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 12 : 665—668.
5) Official Methods of Analysis of the A. O. A. C. (1950), pp. 37.
6) 川口桂三郎，福谷博 (1954)，土肥誌，25 : 107—110.

ラッテ及びモルモットの子宮の *in vitro* 自発運動に対する Relaxin Preparation の抑制効果

和田　宏・湯原正高

Inhibitory Effect of Relaxin Preparation upon Spontaneous Uterine Contractions of the Rat and the Guinea pig *in vitro*.

Hiroshi WADA, Masataka YUHARA

In order to know the meaning of relaxin in physiology of reproduction, its effect upon spontaneous uterine motility *in vitro* has been studied, using the uterus of the rat or of the guinea pig. As it has been known that guanidyl groups of arginine are essential for physiological activity of relaxin, influences of arginine and guanidine upon the uterine motility *in vitro* were also studied.

(1) The animals used were primed with injections (daily 3γ for 3 days in the rat, daily 3γ for 4 days in the guinea pig) of estradiol monobenzoate in refined seasame oil at least twelve days in the rat and three months in the guinea pig after castration. On the day following the last injection, the uteri of these animals were excised and immediately immersed and kept in cool Locke's solution in the rat and Tyrode's solution in the guinea pig until the test which usually was carried out within five hours. The uterine segment was suspended in a glass chamber of the solution aerated with oxygen, which was mounted in a constant temperature bath at 37°C. Each segment was tied to a heart lever in Magnus's apparatus under 1.5 gm. tention and its isotonic motility was recorded on a smoked drum of kymograph.

(2) Relaxin inhibits the spontaneous uterine motility of the rat and the guinea pig to various extent by causing relaxation of uterine muscle. Even a concentration as little as 0.025 GPU/cc. of relaxin produced an appreciable effect, but at a concentration of 0.05 GPU/cc. its effect was more remarkable. As dose increase, further inhibition was observed. Its threshold, however, could not be determined because its effect varied in different segments. Sometimes, relaxin failed to cause the inhibition of the uterine contractions expected in spite of quite a large dose which was used. Generally, the longer the time elapsed after start of uterine contraction was, the smaller sensitivity of the uterus to relaxin was.

(3) The patterns of uterine motility at various doses of relaxin preparation were roughly classified into following three groups. But, motility of guinea pig uterus was somewhat irregular in itself.

A : The amplitude of contractions decreases to various extent.

B : One (rarely two) of normal contraction is observed at a regular interval in the low saw-toothed contractions with normal frequency.

C : The uterus is completely relaxed and quiescent.

(4) The uterus which had been relaxed by relaxin responded to electric stimulation. The threshold of electric stimulation which is able to cause uterine contraction rose as the the effect of relaxin increased. The responses were classified roughly into the following three groups, according to the state of contractions appeared.

(i) Only one contraction (rarely two) appears by one stimulation.

(ii) Several or more contractions appear and the contractions cease shortly.

(iii) Contractions appear and return gradually to the initial amplitude.

(5) Guanidine (hydrochloride) increased the frequency of uterine contraction, but at a huge dose it showed even an oxytocic effect upon uterine motility. Arginine (hydrochloride) has not any effect upon uterine motility. From these results, it may be concluded that the effect of relaxin upon uterine motility is not due to guanidyl groups themselves, but to relaxin itself as a compound.

(6) Relaxin did not show any appreciable effect intestinal contractions *in vitro*; therefore, it seems that relaxin is not a general smooth muscle depressant.

Acknowledgments

The authors wish to thank Dr. Edward H. Frieden and Dr. Robert L. Kroc for the kind help respectively.

筆者等は，これまでにウシ，ヒツジ，ヤギなど反芻家畜の妊娠血清中に Relaxin が検出せられること，またウシなどの尿中に少量ながら此の物質が排泄せられていることを報告した．此のように妊娠と密接な関係のある此の物質の繁殖生理上に於ける意義，特に反芻家畜の子宮運動に対し如何なる作用を及ぼすかを検討するために此の実験を行つた．然し乍ら此の目的に対し実際にウシやヒツジなどの子宮運動の観察は困難であるのでラッテ及びモルモットの子宮を用い，その *in vitro* な運動に対する Relaxin の薬理的作用を観察し，これからウシその他の反芻家畜に於ける場合の Relaxin の効果を類推した．

なお，Relaxin の生物学的活性に対して guanidyl groups が必須的要素であることが知られているので Arginine 及び Guanidine などの子宮運動に対する影響を観察し，またさらに子宮運動に関し，これらの物質と Relaxin の作用との関係について観察したので，それらの結果について報告する．

I 実験材料及び方法

此の実験に用いたモルモットは何れも卵巣剔出後，少くとも3ケ月を経過したものであつた．またラッテは何れも卵巣を剔出後，少くとも12日以上経つたものであつた．これらの卵巣剔出動物のうち，モルモットに対しては，胡麻油に溶かした Estradiol monobenzoate の 3γ を日量として4日間，背部皮下に注射し，その翌日，子宮を剔出して実験に用いた．ラッテに対しては同じく Estradiol monobenzoate を 3γ づつ3日間，皮下注射し4日目に子宮を剔出して供試した．

これらの剔出した子宮は直ちに冷い栄養液に浸して5時間以内に実験に供した．栄養液としてはモルモットの場合は Tyrode's solution を用い，ラッテの場合は Locke's solution を用いた．使用した Locke's solution は普通の組成（1立中に NaCl 9g, KCl 0.42g, $CaCl_2$ 0.24g, $NaHCO_3$ 0.5g 及び Glucose 1g を含む）のものであつたが，Tyrode's solution は子宮運動促進の目的のも

とに Ca の量を若干増量し次の如き組成のものとした．即ちその１立中の各成分の量は次の如くである．

NaCl　8.00g,　KCl　0.20g,　$CaCl_2$　0.24g　$MgCl_2$　0.10g,　NaH_2PO_4　0.05g

Glucose　1.00g　$NaHCO_3$ 適宜加えて pH 7.4 に調節．

予備実験的にモルモットの子宮片を浸した栄養液中に絶えず空気を送つたが，子宮の収縮が強直性になり，好ましくなかつたので，本実験は，すべて酸素瓦斯を栄養液中に送りながら行つた．37°C の恒温水槽中に保定したガラス容器に栄養液 40cc を入れ，之にラッテまたはモルモットの子宮片を入れ，酸素を通じながら Magnus の方法によつて isotonic な運動を行わせ，kymograph を用い，それを煤煙紙上に描記させた．ラッテに於いてもモルモットに於ても子宮標品は普通状態に於いて２乃至 2.5cm の長さにし，その両端をセルフィンで挾んで吊り，何れの場合にも 1.5g の張力が働くように錘を懸けた．

此の実験に用いた Relaxin preparation は Dr. E. H. Frieden から寄贈を受けたもので製品記号は P-123-1，その力価は 1mg 当り 20～40GPU の凍結乾燥品であつた．筆者等は此の Relaxin を検定し，その力価を 20GPU/mg と決め使用した．Guanidine としては Guanidine hydrochloride（片山化学株式会社製），また Arginine としては Arginine monochlorohydrate（日の出製薬株式会社製）を用いた．Estradiol monobenzoate としては帝国臓器株式会社の Ovahormon benzoate を用い，また Oxytocin としては同じく帝国臓器の Atonin-O を用いたが，その0.5cc 中に５国際単位の Oxytocin を含むものである．被検試薬及び Oxytocin を，それぞれ少量の栄養液に溶解し，子宮片を入れたガラス容器中に注加してその効果を観察した．

II　実験成績及び考察

ラッテは子宮運動の研究材料として種々の利点をもつており，モルモットは性周期も不明瞭であり特定の目的以外には子宮の運動研究には必ずしも好適でないことが一般に知られている．筆者等の実験に於いても，モルモットの子宮はラッテのそれに比し不規則な運動を行い，また強縮状態に陥り易く，子宮運動の実験材料として充分満足なものではなかつた．またモルモットの同一の子宮角を中央で切断し子宮頸管を含む部分と子宮角尖端を含む部分に分けて，その運動を観察した．その結果，その子宮標品に含まれる収縮波の発動部の数及びその存在位置とも関連あるものと思推せられるが子宮角尖端を含む部分よりも頸管部を含む部分が稍々規則的な運動を示すように思われた．然しながら此の両部分の運動性に本質的差異があるものとは思われなかつた．何れにしても，前述のモルモットとラッテの場合の如く，動物の種類により，少くとも *in vitro* の子宮運動の様子に差異のあることが判つた．

〔I〕　子宮の収縮に対する Relaxin の抑制効果

Relaxin の効果に対するモルモットの子宮の感受性は個体により，時には標品により，かなりの差異が認められる．筆者等は任意に標準を定め，栄養液に Relaxin を注加して子宮標品の攣縮高が，その標品の正常の攣縮高の少くとも 20～25％低減したとき，Relaxin による収縮抑制効果の発現と判定することにした．本実験に於てはモルモットの子宮は16例を供試した．その中，10例については種々の程度に Relaxin による収縮抑制効果を認めたが，残り６例については，その効果を認め得なかつた．Relaxin に対する此のような感受性の差異の原因の一部は，その標品の剔出前に於ける生理的条件及び剔出後の処理により或る程度左右せられるであろう処の Actomyosin などの量的関係によるものと思推せられる．

子宮の攣縮の抑制せられた例に於ては，40cc の栄養液に対し 1GPU の Relaxin の添加，即ち 0.025GPU/cc の Relaxin 濃度で抑制がみられ，2GPU の添加では，その効果が一層顕著であつた．一般に Relaxin の濃度の大なる程，子宮に対する抑制効果が大きく，且つその効果が長く持続する．その有効時間は，0.05GPU/cc の濃度で10数分乃至20分程度のものが比較的多かつた．然して0.15GPU/cc の濃度で略々1時間の効果を示した例もあり，また僅か0.045GPU/cc の濃度で略々1時間も有効で子宮は完全に弛緩したままの例もあつた．従つて Relaxin の子宮運動抑制の効果持続時間も一概に決めることは出来ず，子宮標品の状態，条件によりて，かなり著しく異るように思われる．

Relaxin により子宮運動が稍々完全に抑制せられた場合でも，ほぼ一定の間隔で1個づつ正常攣縮の現れることがある．斯かる場合には極く低い鋸歯状の攣縮の間に，略々規則的間隔で正常攣縮がみられる．

同一の子宮標品に対し等量またはそれ以上の量の Relaxin を反覆添加した場合，その効果は最初の効果よりもかなり低減する傾向がみられ，効果の現れない場合もある．また，はじめから Relaxin の効果の認られない子宮標品のあることは前述したが，之等に対し多量の Relaxin を反覆添加しても効果はみられなかつた．例えば最初に 2GPU 添加して効果がみられなかつたので，5 GPU，10GPU とほぼ20分間に2回，合計 15GPU の Relaxin を追加した場合も，また最初に 2GPU で効果の無かつた標品に対し20分間に 6GPU，18GPU と2回，合計24GPU の追加に於ても，子宮の運動に対する Relaxin の抑制効果は観察されなかつた．

なお，組織への滲透性の増加の可能性により Relaxin の作用を助長するかも知れぬと云う仮定のもとに 10.000V.R.U. の Hyaluronidase 製品を加えたが，此の目的に対し Hyaluronidase は何の効果も示さなかつた．

ラッテの子宮を用ての観察も，モルモットのそれと略々同じであるが，ラッテの子宮運動が規則的であるだけに Relaxin の効果の観察に便であつた．本実験に於て観察した子宮の正常な自発的攣縮数は10分間に6～12回の範囲にあり，多くのものは8～10回であつた．

ラッテの子宮に対する Relaxin の閾値は確めなかつたが，40cc の栄養液に対し 4GPU の注入は著しい効果を示した．また，或る標品に対し 4GPU の Relaxin の添加は顕著な効果なく，僅に数分間子宮運動を抑制したに過ぎないが，此の同一子宮標品に対し 10GPU の追加添加は顕著な効果を示した．此のように個体により Relaxin に対する感受性に差があり，また一般に用量の増加と共にその効果が顕著になることはモルモットの場合と同様である〔Fig. 1〕．

子宮運動が完全に抑制せられた場合は子宮は弛緩したままで攣縮はみられないが，時間の経過と共に攣縮が現れ，収縮力の回復につれて攣縮はその頻度と高さを次第に増加して正常に復するものである．然しながら攣縮の頻度と高さの回復は必ずしも平行するものでなく，後者の回復せるにもかかわらず前者の回復しない例のあることも観察された〔Fig. 1〕．本実験の条件下で攣縮の正常状態への回復に要する時間，即ち Relaxin の有効時間は，その用量によりて異ることは当然であるが，1回に2～4GPU/cc 程度の添加で略々10～40分間有効であつた．

また Relaxin の子宮運動抑制効果が稍々不完全な場合は攣縮高が種々の程度に低減する型と，抑制せられて小さくなつた攣縮の略々一定の規則的間隔毎に正常な攣縮の現れる型の二型に大別されたが，これもモルモットの場合に観察されたことである〔Fig. 2〕．

一般に筋肉運動に於ける疲労に際し一定の化学的物質が生成すると考えられ，これが所謂疲労素である．然しながら疲労は単に疲労素の生成のみが原因ではなく，興奮（筋肉では収縮）のエ

ネルギー源となる物質の損耗が関係しており，此の他に疲労現象の一部は刺戟または作用物質に対する感受性成立の困難が原因と考えられる．

一方，Csapo, A. (1948～52) その他の研究があり，収縮性蛋白に関して云うならば筋収縮の単位は Actomyosin より成る Filament であり，活発な ATP の協力により Actomyosin は Actin と myosin になる．従つて ATP の濃度が大であると弛緩に都合がよく，濃度が小であると収縮し易いと云われている．

剔出直後に供試した子宮は，不規則な運動を示し，一般に剔出後，数時間，冷 Locke's に保存した子宮に比し，Relaxin に対する感受性が鈍いように思われた．また冷 Locke's に保存した標品は室温で Locke's に保存した標品に比し，剔出後，より長時間 Relaxin が有効であつた．

即ち子宮筋が fatigue の状態にある程，Relaxin は作用し難いようである．然しながら当然期待せられるにもかかわらず Relaxin の効果のみられない個体がラッテに於てもみられたが Acethylcholin の如き筋肉収縮励起作用のある物質が特に強く作用している可能性も考えられる．

また子宮が長時間の運動後 exhaustion の状態に陥り，攣縮高の低い相当著しい疲憊曲線を描くようになつた標品では Relaxin に対する感受性は成立し難い．此のような Relaxin に対する感受性の不成立またはその困難は，定義は漠然としているが疲労素やエネルギー源を含めて，Relaxin 阻害物質の生成，存在か，Relaxin の効果発現に協力助長する物質の損耗，欠除に因るか，または此等二つの原因の協同によるものか明らかではない．推察の域を脱しないが，此の二つの原因の何れも Relaxin に対する感受性不成立の要素となり得るが，阻害物質生成が，より重要な要素であるように思われる．

〔II〕　電気刺戟誘起攣縮に対する Relaxin の抑制効果

Du Bois-Reymond の Inductorium を用い5～30ボルトで1～5, 6秒，またはそれ以上の時間，通電して子宮標品を刺戟した．刺戟閾値は標品によりて異るので一概には云えないが数ボルト乃至30ボルト，数秒乃至20秒の通電中またはその開放電撃により，Relaxin で弛緩した子宮の攣縮が誘起せられた．電気刺戟に対する反応の型により弛緩の程度は次の三つに大別される．即ち1電気刺戟で1攣縮のみ現われ，それ以外の時は子宮は弛緩したままで完全に運動を停止している場合〔Fig. 3〕，電気刺戟を絶ちたる後も，なお暫くの間は攣縮を反復し，やがて子宮は再び完全に停止する場合〔Fig. 2〕，及び電気刺戟により誘起せられた攣縮を機とし正常攣縮に復帰する場合などである．

等時的間隔で電気刺戟により誘起した規則的攣縮が，Relaxin 添加後は同一の刺戟量に対し攣縮高が著しく低下し刺戟時以外は運動の完全な停止をみる場合もある〔Fig. 3〕．此のような状態の子宮標品も時間の経過につれ Relaxin の効果が漸減すると共に自発性攣縮を現わし次第にその高さを増して正常になる．

Relaxin が有効に作用していると思われる子宮標品に対し電気刺戟を反覆すると刺戟閾値は次第に増大する傾向がある．即ち同一程度の攣縮に対し，より大きな刺戟量を要するようになるが，之は一般の筋の場合と同様，疲労に基くものと思われる．

筋が興奮開始後，弛緩するまで一定の期間は外界からの如何なる刺戟にも応じない．此の不応期は本実験に於けるモルモットやラッテでは比較的長かつた．不応期以外の時期に於ける電気刺戟の効果はラッテ及びモルモットにつき共に観察せられる．然し 40cc の栄養液に対し 3.6GPU の Relaxin の添加で完全に弛緩したモルモットの子宮の1例は数回の充分な量の電気刺戟に反応しなかつた．これは僅か1例のみの経験であるから Relaxin によつて完全に弛緩したものは

絶対不応期は勿論のこと，相対不応期以外の時期に於ても電気刺戟に反応しないとは断定しかねる．

〔III〕　子宮運動に対する Guanidine 及び Arginine の影響．

40cc の栄養液に対しモルモットの子宮の場合は 20mg，ラッテの子宮の場合は 30mg，40mg，65mg の塩酸 Arginine を添加したが子宮運動には何等の影響も認められなかつた〔Fig. 4〕．従つて guanidyl 基を有するけれども Arginine は子宮運動に対し無影響であること，また使用した塩酸 Arginine は80％の L-Arginine を含むものであり pH 等の多少のイオン的変化は，まぬかれないと思われるが此の程度の変化は子宮運動に対し殆ど影響を与えないことなどが判つた．

Guanidine は筋神経節合部を興奮せしめ筋の線維性攣縮を起すことが知られている．*in vitro* で運動中のモルモットの子宮に対し，その栄養液 40cc 中に塩酸 Guanidine 20～40mg 添加したが数分くらい経つと子宮の運動は増進し単位時間内に於ける攣縮数は増加した．予め Relaxin を添加した標品に対しても Guanidine は線維性の攣縮を起した〔Fig. 5〕．また30mg の塩酸 Guanidine を加え攣縮数を増加したモルモットの子宮標品に対し 3 GPU 及び 10GPU の Relaxin 添加では何の効果も認められず，また 12GPU の添加により攣縮の基線が稍々低くなり攣縮数も稍々減少した様に思われたが何れにしても明らかな抑制効果は認められなかつた．これらのことはラッテでも同様に観察された．Relaxin の作用の機構に関し筋神経接合部と Relaxin の直接の関係は明らかでないが Guanidin などで筋神経接合部を興奮せしめた標品に対しては Relaxin は効き難いように思われた．

また Guanidine と Oxytocin の関係をみるならば，後者が強く作用している間は，前者の効果は後者による強縮に覆い隠されて了う．ラッテの子宮を用い，栄養液 40cc に対し 0.06 I. U. の Oxytocin 添加後，数分して塩酸 Guanidine 40mg を添加したが Guanidine の効果はみられなかつた．同じくラッテの或る標品に対し 50mg の塩酸 Guanidine の添加により攣縮数の増加と共に僅かではあるが基線の上昇が認められた．さらに他の標品で 100mg の塩酸 Guanidine の添加は不完全ながら強縮を起し Oxytocic な効果を示した．さらに，これを流して新しい栄養液と置換したときは漸次もとの自然の攣縮に復帰した〔Fig. 4〕．此の場合の強縮は栄養液のイオン的変化の影響とも思われず多量な Guanidine のために生ずる Oxytocic な効果によるものと思われる．

Relaxin の生物学的活性に対し Guanidyl 基が必須的要素であることが知られているが，子宮の *in vitro* の運動に対し Arginine は無関係であり，Guanidine の作用は Relaxin の作用と全く相反する．従つて Relaxin の作用は単なる Guanidyl 基の作用によるものではなく，Relaxin そのものの効果によるものである．

最近，牝豚卵巣の抽出液の静脉内注射により，モルモットの子宮運動が著るしく抑制されることを Krantz, J. C. et al. (1950) が報告しており，また Sawyer, W. H., Frieden, E. H. and Martin, A. C. (1953) は牝豚の Relaxin 含有抽出物が *in vitro* でラッテの子宮運動を抑制することを報告しているが，後者の結果と筆者等の結果は大体に於いて一致する．また前者の結果から考えると Relaxin は筆者等の観察した子宮に対する *in vitro* の効果と略々同様な効果を *in vivo* でも，もつものと思われる．然して，これらは単に，これらの実験小動物に対してのみならず反芻家畜の子宮に対しても云い得るであろうことが類推せられる．子宮筋は妊娠前には Actomyosin が少なく特に Actin が少ないので収縮性を示さないが，妊娠中には Actomyosin が増加し臨月には最大に達し分娩後は減少する．然して収縮性は妊娠中に増大し分娩時に極大に達するものであり，これらは Steroid ホルモンの作用によりて支配せられると云われている

(Csapo, A., 1950). 妊娠中の子宮が Relaxin により収縮性を抑制されていると云う考えからすれば Relaxin と収縮性蛋白の間に直接または間接の関係があることが推察せられる. Relaxin とか Oxytocin, さらに上述の様な諸物質の関係が子宮の「トーヌス」に影響を及ぼすものと思われる. なお，子宮の場合と同様にして行つた小腸（回腸）の運動に対し Relaxin は評価すべき効果を示さなかつた. これは筆者等の報告[5]の如くに Trypsin や腸浸出液などが子宮運動に対する Relaxin の作用を阻害することとも関連があるものと思われる. 兎に角，妊娠中のホルモンとして当然ではあるが，Relaxin は消化器には作用しないので一般平滑筋の depressant ではなく，その効果は専ら生殖器とか骨盤に対して示されるものである.

本研究を行うにあたり，本学医学部福原武教授及び本学農学部小松伊三郎教授より種々助言御指導を戴いた. ここに記して深謝の意を表する.

III 摘　　要

繁殖生理上に於ける Relaxin の意義を知るために，ラッテ及びモルモットの子宮を用い，その *in vitro* 自発運動に対する Relaxin の効果を研究した. Guanidyl 基が Relaxin の生物学的活性に対する必須要素であることが知られているので子宮運動に対する Arginine 及び Guanidine の影響の研究も行つた.

1) 使用動物は卵巣剔出後，ラッテでは少くとも12日，モルモットでは3ケ月以後に精製胡麻油溶の Estradiol monobenzoate の注射（ラッテは1日3γ，3日間；モルモットは1日3γ，4日間）で発情させ，その翌日，これらの動物の子宮を剔出し，直ちに冷 Locke's または Tyrode's solution に浸し5時間以内に供試した. 37°C の恒温水槽中に保定し，酸素を通じた Locke's または Tyrode's を入れたガラス容器中に子宮片を入れ，それを Magnus 装置の筆桿に結び付け，1.5g の張力のもとに，その等張的運動を Kymograph の煤煙紙上に記録した.

2) Relaxin は子宮筋の弛緩を起してラッテやモルモットの子宮の自発運動を種々の程度に抑制する. 0.025GPU/cc の濃度でも相当の効果を示したが 0.05GPU/cc の濃度では，その効果は一層著しかつた. 用量の増加につれ一層の抑制が観察せられた. 然しながら，その効果は子宮の状態によつて異るので閾値を一概に定めることは出来なかつた. 時には大なる用量であるにもかかわらず Relaxin は期待せられる子宮の攣縮を抑制し得ないことがあつた. 一般に攣縮開始後の時間が長くなるにつれて，Relaxin に対する子宮の感受性は小さくなつた.

3) Relaxin の種々の用量による子宮の運動の型は概略，次の3つに分けられた. 然しながらモルモットの子宮運動はやや不規則であつた.

A：攣縮高が種々の程度に低減する.

B：正常頻度をもつた低い鋸歯状攣縮の略々一定の間隔で正常の1個（稀に2個）の攣縮が観察せられる.

C：攣縮は無く子宮は完全に弛緩し動かない.

4) Relaxin で弛緩した子宮も電気刺戟に反応した. 攣縮を生ぜしめる電気刺戟の閾値は Relaxin の効果の増すにつれて高まつた. これらの反応は現われる攣縮の状態により次の3つに大別された.

（i）　1刺戟で1（稀に2）攣縮が現われる.

（ii）　1刺戟で数個またはそれ以上の攣縮が現われ間もなく攣縮は止む.

（iii）　刺戟を機に攣縮が現われ漸次もとに復帰する.

5) Guanidine（塩酸塩）は子宮の攣縮の頻度を増したが，然し大量に於ては子宮運動に対し

Oxytocic な作用さえも示した．Arginine（塩酸塩）は子宮に対し何の効果も示さなかつた．これらの結果から子宮運動に対する Relaxin の抑制効果は単なる Guanidyl 基によるものではなく Relaxin そのものの効果によるものである．

6）Relaxin は腸の *in vitro* な運動に対しては評価すべき効果を示さなかつた．従つて Relaxin は一般的な平滑筋鎮静物質ではないように思われる．

文　　献

1) Abramowitz, A. A., Money, W. L., Zarrow, M. X., Talmage, R. V., Kleinholz, L. H. and Hisaw, F. L. (1944): Preparation, biological assay and properties of relaxin. Endocrinol., **34**, 103—114.

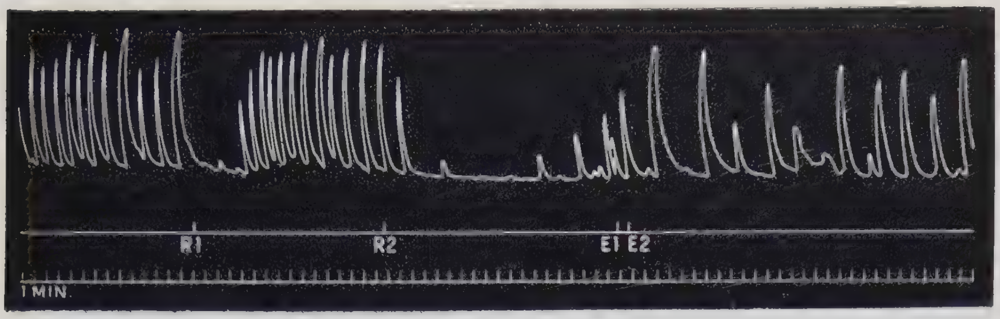
2) Frieden, E. H. and Hisaw, F. L. (1951): The biochemistry of relaxin. Recent progress in hormone research. Proceedings of the Laurentian Hormone Conference, **8**, 333—378.

3) Felton, L. C., Frieden, E. H. and Bryant, H. H. (1953): The effects of ovarian extracts upon the guinea pig uterus *in situ*. J. Pharmacology and Expt. Therapeutics, **107** (2), 160—167.

4) Sawyer. W. H., Frieden, E. H. and Martin, A. C. (1953): *In vitro* inhibition of spontaneous contraction of the rat uterus by relaxin-containing extracts of sow ovaries. Amer. J. Physiology, **172** (3), 547—552.

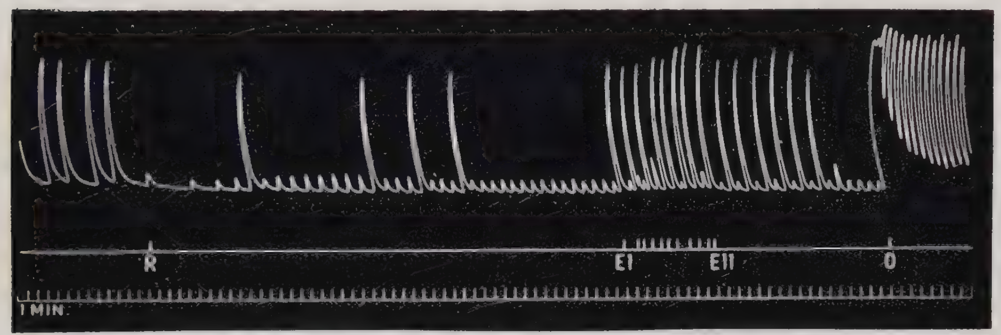
5) Wada, H. and Yuhara, M. (1956): Experimental inactivation of relaxin and disturbances by oxitocic substances towards inhibition of relaxin upon uterine contractions *in vitro*. (in Japanese) Sci. rept. Facul. Agr. Okayama Univ., No. 9, 21—30.

Fig. 1. Effect of relaxin upon spontaneous contractions of the rat uterus *in vitro.* 40 cc. chamber, 37°C.



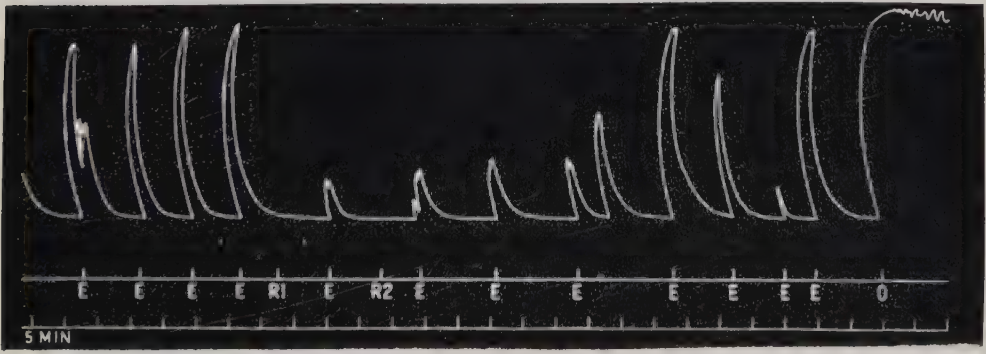
R1 : 4 GPU of relaxin
R2 : 10 GPU of relaxin
E1 : Electric stimulation, 15 volts, 1 sec.
E2 : Electric stimulation, 15 volts, 1 sec

Fig. 2. Saw-toothed contractions appeared in the rat uterus which was affected by relaxin *in vitro,* and the uterine responses to electric stimulation and oxytocin. 40 cc. chamber, 37°C.



R : 10 GPU of relaxin
EI-EII : Electric stimulation, 30 volts, 2—8 sec.
0 : 0.01 I.U. of oxytocin

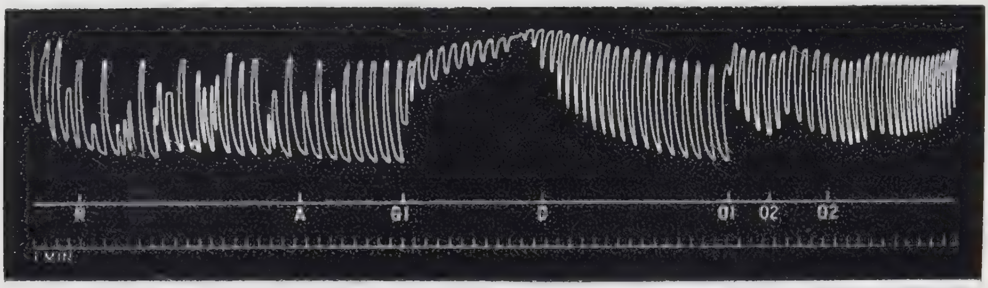
Fig. 3. Contractions induced by electric stimulation in the guinea pig uterus which was relaxed by relaxin. 40 cc. chamber, 37°C.



R1 : 1.8 GPU of relaxin
R2 : 1 GPU of relaxin
E : Electric stimulation, 25 volts, 20 sec.
0 : 0.05 I.U. of oxytocin

Fig. 4. Influences of guanidine (hydrochloride) and arginine (hydrochloride) upon spontaneous contractions of the rat uterus *in vitro.*

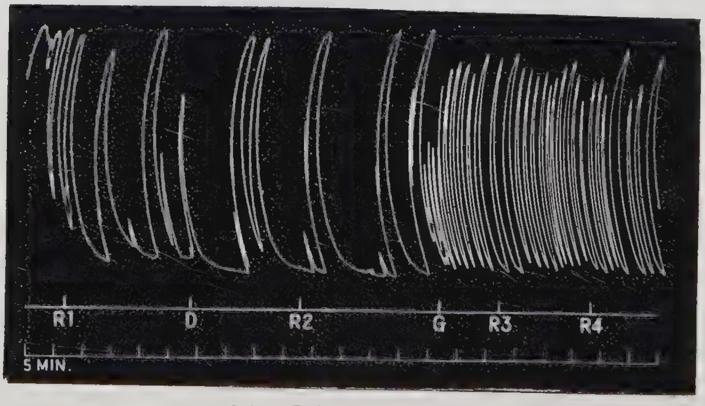
40 cc. chamber, 37°C.



R : 20 GPU of relaxin
A : 60 mg. of arginine
G1: 100 mg. of guanidine
D : Drain
O1: 0.1 I.U. of oxytocin
O2: 0. 1. I.U. of oxytocin
G2: 50 mg. of guanidine

Fig. 5. Influence of guanidine (hydrochloride) on the spontaneous contractions of the guinea pig uterus *in vitro.*

40 cc. chamber, 37°C



R1: 5 GPU of relaxin
D : Drain
R2: 1 GPU of relaxin
G : 20 mg. of guanidine
R3: 3 GPU of relaxin
R4: 10 GPU of relaxin

Relaxin の実験的不活性化及び Relaxin の *in vitro* 子宮攣縮抑制に対する Oxytocic な物質の阻害

和田　宏・湯原正高

Experimental Inactivation of relaxin and Disturbances by Oxitocic Substances towards Inhibition of Relaxin upon Uterine Contractions *in vitro.*

Hiroshi WADA,　Masataka YUHARA

Influences of heating, digestion with proteolytic enzyme and aeration with oxygen upon two main physiological activities of relaxin — relaxation of symphysis pubis and inhibition of uterine motility *in vitro* — were studied in these experiments. Besides, effects of oxytocin, typsin preparation, muscle extract and intestinal extract upon the uterine motility were studied; we found that they disturb the effect of relaxin uterine motility by their oxytocic influences.

(1) Relaxitive effect of relaxin preparation upon the symphysis pubis was lost by digestion with trypsin or pepsin at 37°C. for two hours.

(2) Relaxitive effect of relaxin preparation upon the symphysis pubis was scarcely diminished by heating at 63°C. for 30 minutes, but it was lost by heating at 63°C. for one hour. However, inhibitory effect of relaxin preparation upon spontaneous uterine motility *in vitro* was not lost by heating at 63°C. for one hour, but it was lost completely by heating at 100°C. for one hour. Accordingly, it seemed that temperatures which destroy these two physiological effects above mentioned of the relaxin preparation differ from each other.

(3) Exposure to aeration with oxygen (60cc./min. for 4 hours) did not diminish relaxin activity.

(4) From these results, relaxin is relatively labile to heating; and in view of digestibility with proteolytic enzym, it seems likely that relaxin is a polypeptide as other investigators have already reported.

(5) The trypsin preparation used showed a remarkable oxytocic effect upon the uterus as oxytocin. After heating at 63°C. for one hour or at 100°C. for 30 minutes, trypsin preparation showed a little oxytocic effect; but its oxytocic protency was destroyed completely by heating at 100°C. for one hour.

(6) Pepsin preparation did not show any influence upon the uterine motility in neutral solution which was, however, not a suitable condition for enzymatic activity of pepsin.

(7) The muscle and the washed intestine (ileum) of the rat were immersed in Locke's solution at 0°C. or 37°C. for 4 hours. Both the extract of muscle and that of intestine showed oxytocic effect, and the effect of the latter was somewhat more

effective than that of the former. Accordingly, there seems to be various relaxin inhibitor concerning uterine motility *in vitro*.

(8) Oxytocin itself, owing to its nature, inhibited the effect of relaxin, but a very exhausted uterus responded neither to oxytocin nor to relaxin.

筆者等はこれまでに反芻家畜に於ける Relaxin の存在及び *in vitro* の子宮の運動に対する Relaxin の抑制効果を報告した. Relaxin の一般的性質を知る為に加熱, 蛋白分解酵素による消化などにより Relaxin の実験的破壊を企みた. また, これと関連して, Oxytocin は当然明らかに *in vitro* で子宮運動に対する Relaxin の効果を抑制したが, 此の他に Trypsin 製品や腸管及び筋肉浸出液が Oxytocic な作用を呈して Relaxin の効果を阻害することを知つたので, これらの知見もあわせて報告する.

I 実験材料及び方法

〔I〕 Relaxin の実験的不活性化

力価既知の Relaxin preparation に対し加熱, 酸素ガスの通気及び蛋白分解酵素による消化などの処理を行い, その試料の Relaxin 力価を検定し不活性化の程度を検べた. Relaxin の検定は筆者等がこれまで述べた如く Abramowitz et al. (1944) の方法を僅に修飾した方法によつた. 従つて此の場合, 恥骨反応に対する効力の低減の検定を意味するものである.

本実験に於て用いた Relaxin 製品は Dr. Frieden, E. H. の厚意により寄贈を受けたもので前報に於て用いたものと同一のものでその製品記号は P-123-1, その力価は 20〜40GPU/mg の lyophilized preparation であつた. 筆者等は此の Relaxin 製品を検定しその力価を 20GPU と認めて使用した. Relaxin 製品は一様に 4GPU/cc の濃度に溶解したものを原液とし, これをそのまま, または夫々の処理を施してモルモット1頭に対し 2GPU 即ち 0.5cc づつ1回注射した. 2GPU の Relaxin では供試動物の殆ど総べてのものが反応して恥骨弛緩を生ずる筈であり, 非反応動物数により Relaxin 不活性化の程度を知り易いためである. これらの Relaxin 含有試料に対し 63°C または 65°C で30分及び1時間, また 100°C で1時間加熱を行つた.

蛋白分解酵素として持田製薬株式会社製の Trypsin (lyophilized crystalline Trypsin) 及び Grübler 製の Pepsin を用いた. 20〜25 GPU の Relaxin 含有容液に対し 10,000 H. U. M. (Haemoglobin Unit of Mochida) 及び20,000 H. U. M. の Trypsin を加え 37°C で2時間, 加温し消化を行つた. 此の場合, 緩衝液としては pH 7.1 の Sörensen の燐酸緩衝液 (Na_2HPO_4 6.6mg/cc + KH_2PO_4 2.7mg/cc) を用い之に Relaxin と Trypsin を加え 37°C で接触させた. 従つて此の対照試験として Relaxin のみを緩衝液に溶解し 37°C, 2時間の加温も行つた.

Pepsin は Sörensen の pH 1.8 の枸櫞酸－塩酸緩衝液に溶解し, これに 20〜25GPU の Relaxin を混じ 37°C で2時間消化し, 之を小量の NaOH 液で中和してから供試した.

酸素ガスによる通気はガラス細管の先端を, 30GPU を溶解した 15cc の Relaxin 溶液の容器の底に入れて, ほぼ 60cc/min 程度の速度で O_2 を出して1時間及び4時間, 酸化を行つた.

以上の如き不活性化 Relaxin 試料を検定用モルモットに注射し, その骨盤弛緩に対する力価を検定し, 種々の処理による不活性化の程度を検べた. さらに, 次の〔II〕の実験と同様な方法で Magnus 装置 (栄養液 40cc を使用) のもとに, 熱不活性化 Relaxin の子宮運動に対する効果の有無を観察した.

〔II〕 Relaxin の子宮攣縮抑制効果に対する Oxytocic な物質の阻害.

卵巣剔出後少くとも12日以後の成熟ラッテに Estradiol monobenzoate を3γ づつ3日間注射し，4日目に剔出し直ちに冷栄養液中に保つた子宮を此の実験に用いた．栄養液としては Locke's solution を用い，その量を 40cc とし，Magnus装置のもとで前述の子宮標品の *in vitro* の等張的運動（張力 1.5g）を行わせ，それを Kymograph の煤煙紙上に記録した．〔I〕の実験に於て Trypsin で不活性化した Relaxin 溶液が完全消化されたか否かを検べるために被検試料の子宮運動に対する影響を検討中に Trypsin 製品が Oxytocic な作用を呈することを知ることが出来た．此の関係をさらに検討する為に蛋白分解酵素として Trypsin のみならず Pepsin を用いた．また Oxytocin を用いて，それらの関係を比較研究した．供試した Oxytocin は帝国臓器株式会社の Atonin-O で，その 0.5cc 中に5 I.U. の Oxytocin を含むものであり，これを小量の栄養液で稀釈して用いた．また Trypsin は〔I〕に前述した持田製薬株式会社の結晶 Trypsin であり，Pepsin も同じく前述の Grübler の製品であり，これらを夫々小量の栄養液に溶解して 37°C で Relaxin と接触させた．また，これらの蛋白分解酵素の熱不活性化したもの或いは何等の処理を受けず活性のあるものを運動しつつある子宮標品を入れた容器に注加した．但し Relaxin の Pepsin による消化には前述の Sörensen の pH 1.8 の枸櫞酸－塩酸緩衝液を用い，NaOH 溶液で中和してから使用した．なおまた，Relaxin 製品は前述の P-123-1である．

筋の疲労などと Relaxin の作用の関係を確める目的で筋肉及び腸管の浸出液をつくつた．即ちラッテの股筋及び臀筋の略々 2g，または内腔を清水で充分洗滌した小腸（回腸）の略々 2g を何れも細切し 10cc の栄養液に浸して 0°C または 37°C で夫々4時間保つたものである．此の浸出液をそのまま，または加熱し，凝固した場合は均質化して各 1cc を Magnus 装置の容器中に注加して，その影響を観察した．

II　実験成績及び考察

〔I〕　Relaxin の実験的不活性化

Relaxin 製品に対する各種の処理がその力価に及ぼす影響は一括して次表に掲げた．

（i）Relaxin に対する加熱の影響

対照試験として 4 GPU/cc の Relaxin 溶液 0.5cc 宛の注射により，3回とも殆ど全動物の恥骨は弛緩して明らかな反応を呈した．此の中の1例に於て供試モルモット8頭中の1頭のみが反応しなかつたが，これは実験誤差として，本実験のような生物検定では許容されるべき範囲内のものと思われる．従つて使用 Relaxin 2 GPU の注射により，供試動物の殆ど 100%のものが反応することを確認した．

この Relaxin 溶液を加熱した場合，63°C，30分では，その力価は殆ど失われなかつたが，63°C，1時間または 65°C，1時間では恥骨に対する反応は完全に失われ，その力価を検知することは出来なかつた．以上のことから，63°C，30分では非常に不完全ではあるが，63°C，1時間の加熱により Relaxin は，その力価を喪失し，少くとも恥骨反応は完全に失われることを知つた．

次に小量の栄養液に溶かした 5 GPU の Relaxin は63°C，1時間の加熱によりても，なお *in vitro* に於てラッテの子宮の攣縮を抑制し，之を完全に弛緩せしめた〔Fig. 1〕．

然るに 100°C，1時間の加熱を受けた 5 GPU の Relaxin は子宮運動に対する *in vitro* の抑制効果を完全に失つていた〔Fig. 2〕．

従つて，恥骨に対する Relaxin の効果は 63°C，1時間の加熱で失われる．然しながら Relaxin のもつ生理学的活性は 63°C，1時間の加熱でもなお保たれており，明らかな *in vitro* 子宮運動

Table 1. Experimental inactivation of relaxin by heating, aeration, and digestion with proteolytic enzymes.

Treatment		No. of guinea pigs used	No. of animals showing positive response	Relaxin activity of dose, GPU	
				Before treatment	After treatment
Relaxin 1mg./5cc.+None	a)	9	9	2	2.0
〃 〃	〃	8	8	2	2.0
〃 〃	〃	8	7	2	1.8
Relaxin 1mg./5cc.+Heating 65°C., 1hr.	a)	6	0	2	0
〃 〃 63°C., 〃	〃	10	0	2	0
〃 〃 〃 〃	〃	6	0	2	0
〃 〃 〃 30min.	〃	10	8	2	1.4
Relaxin 1mg./5cc.+Incubation 37°C., 2hrs.	b)	10	9	2	1.9
〃 〃 〃 〃 〃	〃	6	6	2	2.0
Relaxin 1mg./5cc.+Trypsin 20,000H.U.M., 37°C., 2hrs.	b)	10	0	2	0
〃 〃 〃 〃 〃 〃	〃	8	0	2	0
〃 〃 〃 10,000H.U.M. 〃 〃	〃	10	0	2	0
Relaxin 1.5mg./7.5cc.+Pepsin 6mg., 37°C., 2hrs.	c)	9	0	2	0
〃 〃 〃 2mg., 〃 〃	〃	8	2	2	0.4
Relaxin 3mg./15cc.+Aeration 60cc/min. 1hr.	a)	10	10	2	2.0
〃 〃 〃 〃 4hrs.	〃	8	8	2	2.0

a : dissolved in physiological saline.
b : dissolved in Sörensen's phosphate buffer solution of pH 7.1.
c : dissolved in Sörensen's citrate buffer solution of pH 1.8; and after digestion with pepsin, the mixture was neutralized and then injected to guinea pigs.

(1) For trypsin, "Trypsilin" which is a lyophilized crystalline trypsin of the Mochida Pharmaceutical Mfg. Co., Ltd. was used and the potency of which is shown by H. U. M. (Haemoglobin Unit of Mochida).
(2) Pepsin used was the Grubler's pepsin preparation.
(3) Relaxin used was preparation P-123-1 assaying 20—40 GPU/mg. which was kindly supplied by Dr. E. H. Frieden; according to our assay its potency was approximately 20 GPU/mg. and this value was used for estimation of relaxin activity in this experiment.

抑制作用を示すが，100°C，1時間の加熱によりて，それらは完全に失われる．Felton, L. C., Frieden, E. H. and Bryant, H. H. (1953) は Relaxin も URF (Uterine Relaxing Factor) も共に子宮弛緩を生ぜしめるが Relaxin は URF の中の一つであることを示唆している．

また此の二つの物質の化学的性質はよく似ていると云われているが，普通の Relaxin 製品中には Relaxin と URF が含まれているとすれば，その混在は子宮に対する効果と恥骨縫合に対する効果に於て耐熱性の不一致の可能性を与える．然しながら筆者等の実験結果は必ずしも Relaxin 製品中また Relaxin そのものに夫々の作用をもつた二つの活性物質の存在を示すものとは限らず，残存活性物質の濃度の差に基くものかも知れないがその可能性は少ないように思われる．

(ii) 蛋白分解酵素による Relaxin の破壊

25GPU 含有の Relaxin 溶液に対し 10,000 H. U. M. または 20,000 H. U. M. の Trypsin を

接触させた．従つて1 GPU 当り 400 H. U. M. または 800 H. U. M. の酵素が作用したことになる．斯く Trypsin で消化した Relaxin 溶液については恥骨法により Relaxin を検出できなかつた．一方使用緩衝液に同じ濃度（2 GPU/0.5cc）の Relaxin に対し 37°C，2時間の加温を行つたが Relaxin の力価の低減はみられなかつた．従つて 37°C，2時間の加温では Relaxin の力価は低減せず，上述の Trypsin 処理による Relaxin の力価の喪失は，Trypsin により Relaxin が消化破壊されたことに起因するものと考えられる．

また既述の濃度の Relaxin 溶液に対し 25GPU 当り 2mg 及び 6mg の Pepsin を加え 37°C，2時間で消化を行つた．その結果，Pepsin 6mg の場合は溶液の Relaxin の消化は完全で恥骨反応は認められなかつたが，2mg の場合は供試動物8頭中の2頭が明らかな恥骨反応を呈し消化は不完全であることを示した．酸性溶液では Relaxin は比較的安定なことが知られている．Pepsin での消化試験は pH 1.8 の枸櫞酸－塩酸緩衝液を用いた訳であるが，酸性溶液の関係もあつてか 2mg の Pepsin の場合，Relaxin の効果の一部は保たれていた．従つて，勿論のことであるが適量またはそれ以上の量の Pepsin によりて Relaxin は消化破壊せられることを認めた．

以上の如く Trypsin や Pepsin により Relaxin は消化されるが，これらの酵素により，おそらく Relaxin の Peptide の結合が切断されて，その力価を失うものと思推せられる．

(iii) Relaxin に対する酸素ガス通気の影響

既述の方法により Relaxin 溶液に酸素ガスを通したが，1時間及び4時間の通気もその力価を低減させることが出来なかつた．筆者等の別の実験からして Hyaluronidase の如き酵素に対しては，著しく力価の低減を生ずる程度の通気であるにもかかわらず，Relaxin では力価の低減はみられなかつた．酸素ガスの酸化作用は，あまり強力なものとは云われないのであるが，兎に角，Relaxin は酸素そのものに対しては相当に安定な物質であることが判つた．

以上，要するに63°C，1時間の加熱及び Trypsin や Pepsin での消化により，モルモットの骨盤に対する Relaxin の効果はみられなくなる．Relaxin の抽出方法からしても Estrogen の混在は考えられず，事実 Abramowitz et al. (1944) は彼等の抽出物の少くとも 120GPU の Relaxin はラッテの膣垢反応に於て角化細胞を出現せしめなかつたことからして Estrogen が含まれていないことを証明している．また，Estrogen は脱落膜反応に於ける progesterone の作用を抑制するが去勢ラッテの子宮の水分含量を増加する．ところが脱落膜反応を抑制するに充分な Relaxin は子宮の水分含量を増加しなかつた．此の点から Frieden, E. H. and Velardo, J. T. (1952) は彼等の Relaxin 製品中に Estrogen が含まれていないことを証明している．筆者等は膣垢法や子宮水分定量法などの試験を行つてはいないが，前述の実験成績は Relaxin は明らかに蛋白質系の物質で，Polypeptide であると言う Frieden and Hisaw その他の報告を肯定するものであり，またその効果に対する Steroid 系物質の混在を否定するものである．

〔II〕　Relaxin の子宮攣縮抑制効果に対する Oxytocic な物質の阻害

(i) Oxytocin による Relaxin の効果の阻害

Oxytocin の子宮収縮作用はすでによく知られた事実である．本実験に於ても小量の Oxytocinで子宮は直ちに収縮した．閾値は求めなかつたが，40cc の栄養液に対し，モルモットの或る子宮標品は 0.04 I. U. の Oxytocin の添加即ち 0.001 I. U. /cc の濃度で不完全な強縮を示した．また，ラッテの或る標品では 0.003 I. U. の Oxytocin の添加で収縮後の弛緩は略々1/2に減退し不完全になつたが，之に対しさらに 0.003 I. U. の添加により完全に強縮し，弛緩は殆どみられず，Plateu に僅に鈍い鋸歯状の攣縮の痕跡をとどめる程度の運動を示した〔Fig. 3〕．

Oxytocin の有効時間は，その用量と略々比例し，小量の場合は単に2，3個の攣縮が強縮するのみであるが量が増すにつれて有効時間が長くなる．大量の Oxytocin では攣縮は完全に強縮して平滑な Plateu を示し運動は全く停止するが，これとても時間の経過につれて個々の攣縮に分離し，その弛緩の谷は次第に深くなり攣縮の基線は円滑な傾斜を示し，もとの運動に復帰する．

Relaxin の抑制効果の現われないような子宮に対しては勿論のこと，Relaxin の効果が略々完全に現われ，子宮は弛緩して全く運動を停止し僅かな電気刺戟では充分に攣縮を起し得なかつたような場合でも，小量の Oxytocin により直ちに強縮した．例えば 0.045GPU/cc の Relaxin 濃度で完全に弛緩したモルモットの子宮で感応電流の弱刺戟に応じなかつたものが 0.2 I. U. 従つて 0.005 I. U. /cc の Oxytocin 濃度で顕著な収縮を示した．また，僅かの電気刺戟に充分に応じなかつた子宮標品が 0.00125 I. U. の Oxytocin 濃度で直ちに収縮した．然しながら予め Relaxin で弛緩せしめたような子宮は，勿論 Oxytocin で直ちに収縮するが，やや多量の Oxytocin 添加でも比較的短時間で正常運動に復帰する．かかる場合，精密に検討すれば単位時間内の攣縮は稍々増加し，恰かも収縮と弛緩が共に刺戟促進せられたような状態が屢々観察された．なお，疲憊した標品に対しては Oxytocin の効果はみられなかつた．以上の諸観察の結果から子宮に対する Oxytocin と Relaxin の関係は，量的関係に基くことは明かであるが Relaxin により弛緩した子宮も Oxytocin によりて比較的容易に収縮することが判つた．然して，此の事は分娩の到来の時期が決る一つの要素になるものであろうと推察される．

（ii）Trypsin 製品の Oxytocic な作用による Relaxin の効果の阻害

蛋白分解酵素による 37°C，2時間の消化により，また 63°C，1時間の加熱により恥骨弛緩に対する Relaxin の効果がみられなくなることは既に述べた．此の場合，恥骨反応以外の効果も失われ Relaxin が完全に破壊されるや否やを確かめる目的もあつて此の実験を行つた．そのために，先づ Trypsin 及び Pepsin そのものの子宮運動に対する影響を検討した．

40cc の栄養液に対し 100°C，30分の加熱を受けた 5,000 H. U. M. の Trypsin の添加は僅かではあるが子宮の収縮を惹起した．また 63°C，1時間の加熱を受けた 2,500 H. U. M. の Trypsin も子宮の軽微な収縮を起した．然るに 100°C，1時間の加然を受けた 2,500 H. U. M. の Trypsin は子宮運動に対し何の影響も与えなかつた〔Fig. 4〕．之に反し，無処理の 2,500 H. U. M. の Trypsin は顕著な子宮の収縮を起こし，Oxytocin の如き影響を与えた〔Fig. 2〕．Trypsin で強縮した子宮に対し 15GPU の Relaxin を添加したが再び子宮を弛緩せしめることは出来なかつた．

以上のことから，Trypsin 製品は *in vitro* で子宮を強縮せしめるが，此の作用は 100°C，1時間の加熱により完全に失われる．従つて此の oxytocic な効果は Trypsin 製品中に含まれているかも知れない無機物質によるものではなく，活性酵素の作用または混在する可能性のある比較的易熱性物質に基くものと思推せられる．Clark，A. J.（1924）により Proteose の或る分解産物はモルモットに於て子宮筋の収縮を惹起することが知られた．Clark の proteose 分解物中に Tryptin などの如き物質の混入の可能性もありうるように思われるし，また筆者等の Trypsin 製品に於ても proteose 分解物の混在を完全に否定することは出来ないように思われる．何れにしても Trypsin 製品には oxytocic な作用があると思われる．従つて Trypsin で 37°C，2時間の消化を受けた Relaxin 溶液は恥骨反応を起こさないが，*in vitro* で oxytocic な効果を示す結果になる〔Fig. 5〕．

Pepsin 6mg を 0.5cc の溜水に溶解して何等の処理も加えないもの，また同じく 6mg の Pepsin の溶液を 63°C，1時間加熱したものを栄養液に添加した場合，子宮運動に対しては夫々何の影響も与えなかつた〔Fig. 1〕．また，Pepsin 6mg と Relaxin 5 GPU を pH 1.8 の枸橼酸一塩酸緩

衝液に溶解し5時間接触させたものも子宮には何の効果も与えず強縮も弛緩もみられなかつた〔Fig. 4〕. 従つて Pepsin は Relaxin を消化してその効果を失わせるが，Pepsin そのものはラッテの子宮に対し何の影響も与えない. 但し Pepsin の酵素的作用の至適 pH は1.8〜2.3くらいで，その作用には少くとも pH 5 くらいより以下であることが望ましいと云われている. 本実験は此の条件を充分満足させていないが，血液や体液には緩衝作用もあり，実際的にもそれらの pH が極端に酸性を示すことは考えられない. *in vitro* に於ける物質の作用が，直ちに必ずしも *in vivo* の効果を示すものではないが Pepsin そのものは子宮運動と無関係であると思われる.

(iii) 筋肉竝に小腸浸出液の oxytocic な作用による Relaxin の効果の阻害

筆者等は運動中の子宮標品に於て疲労素または Relaxin 阻害物質の生成により子宮の *in vitro* 運動に対する Relaxin の作用が抑制されることを前報[7]に於て推定した. 37°C, 4時間の筋浸出液 1cc を 40cc の栄養液に添加した場合， Relaxin で弛緩した子宮は収縮する〔Fig. 1, Fig. 2〕. 但し Relaxin が強く作用していると思われる標品では顕著な子宮の収縮はみられなかつた. 此の浸出液を100°C, 30分及び 63°C, 30分加熱したが，極く僅かながら oxytocic な効果があり，然かも 63°C の場合は 100°C の場合よりもその効果が大きいように思われた〔Fig. 2〕. 従つて此の Relaxin 抑制因子は上述の程度の加熱では完全に破壊されないことが判つた. なお，0°C, 4時間の筋浸出液も僅かながら oxytocic な効果をもつていることは注目されねばならない.

さらに 37°C, 4時間の筋浸出液が評価すべき効果を示さなかつた標品に於て腸浸出液 1cc の添加は oxytocic な効果を示し，その追加注入は，より大きな oxytocic な効果を示した〔Fig. 4〕. これらのことから腸浸出液は筋浸出液よりも，より高い oxytocic 作用を呈し，より強力な Relaxin 抑制因子を含んでいるものと思われる. これは膵液中に分泌せられた Trypsinogen が小腸の Enterokinase により賦活されて Trypsin になること及び筆者等の上述の実験から考えて Trypsinまたはその関連物質の作用に因るものと考えられる. また消化管粘膜のEnterochromaffine Cells などに 5-Hydroxytryptamine が見出され，別名 eramine と呼ばれ滑平筋収縮作用のあることが知られている（Eraspamer, V., 1940〜42）が腸浸出液中には斯かる物質が遊離していることも考えられる.

さらに Bell, G. H. and Robson, J. M. (1935) は妊牛，妊婦の血清から oxytocic な物質を検出しており，これら oxytocic な物質は妊娠の特定の時期と関係がなく，また Cholin 誘導体, Histamine, oxytocin の何れでもないことを確めている. また同時に，此の oxytocic な抽出物中には抗 oxytocic な物質が含まれており静置中に増加することを報告している. 此の抗 oxytocic な物質と Relaxin との関係は判らない. 一方筆者等の筋浸出液中には ATP や Actomyocin, その他の各種の物質の溶出していることが考えられる. 此のように子宮筋の収縮に関係した物質，または oxytocic な物質は相当に多種類あり，これらは子宮に対する Relaxin の作用を阻害するものと思われる.

此の研究を行うに当り，本学医学部山崎英正教授より種々御助言を戴いた. 茲に記して深謝の意を表する.

III 摘　　要

此の実験に於て Relaxin の主なる二つの生理学的効果—骨盤弛緩と *in vitro* 子宮運動の抑制—に対する加熱，蛋白分解酵素による消化，及び酸素ガス通気の影響を検討した. また，Oxytocin の他に，Trypsin 製品，筋肉浸出液及び腸浸出液などが，その oxytocic な効果により Relaxin の効果を阻害することを知つた.

1) Relaxin 製品の有する恥骨弛緩効果は Trypsin 及び Pepsin による37°C, 2時間の消化により失われた.

2) Relaxin 製品の恥骨弛緩効果は63°C, 30分の加熱によりては殆ど低減しなかつたが, 63°C, 1時間の加熱によりて失くなつた. 子宮の *in vitro* 自発運動に対する Relaxin 製品の抑制効果は63°C, 1時間の加熱では保たれていたが, 100°C, 1時間の加熱により全く観察されなかつた. 従つて Relaxin 製品の上述の二つの生理学的効果を破壊する温度は異つているように思われた.

3) 酸素ガスの通気 (60cc/min, 4時間) は Relaxin の効果に何の影響も与えなかつた.

4) これらの結果から Relaxin は比較的易熱性の物質であり, また蛋白分解酵素による消化からして, これまでの研究者が報告している如く Relaxin は polypeptide の一つであるように思われる.

5) 使用した Tryptin 製品は Oxytocin の如く子宮に対し顕著なる oxytocic な効果を示した. 100°C, 30分及び 63°C, 1時間加熱した Trypsin は僅かながら oxytocic な効果を示したが, 此の oxytocic な効果は 100°C, 1時間の加熱によりて完全に失われた.

6) Pepsin の酵素的活性に対して適当とは云えないが, 中性溶液に於て Pepsin 製品は子宮運動に対して何の影響も与えなかつた.

7) ラッテの筋肉及びよく洗滌した腸 (回腸) を 0°Cまたは37°C で Locke 氏液に4時間浸した. これらの筋肉及び腸の浸出液は夫々 oxytocic な効果を示し, 前者の効果よりも後者のそれが, いくらか強いように思われた. 従つて, 子宮の運動に関して, 種々の Relaxin inhibitor があるように思われる.

8) Oxytocin そのものは本来の作用により Relaxin の効果を阻害したが, 疲憊状態に陥つた子宮は Oxytocin 及び Relaxin の何れにも反応しなかつた.

文献

1) Abramowitz, A. A., Money, W. L., Zarrow, M. X., Talmage, R. V., Kleinholz, L. H. and Hisaw, F. L. (1944): Preparation, biological assay and properties of relaxin. Endocrinol., 34, 103—114.

2) Bell, G. H. and Robson, J. M. (1935): Oxytocic properties of blood extracts and their physiological significance. J. Physiology, 84, 351—361.

3) Frieden, E. H. (1951): The effects of cystine and other reducing agents upon relaxin. Archives of Biochemistry, 30, 138—143.

4) Felton, L. C., Frieden, E. H. and Bryant, H. H. (1953): The effects of ovarian extracts upon the guinea pig uterus *in situ*. J. Pharmacology and Expt. Therapeutics, 107 (2), 160—197.

5) Frieden, E. H. and Hisaw, F. L. (1951): The biochemistry of relaxin. Recent progress in hormone research. Proceedings of the Laurentian Hormone Conference, 8, 333—378.

6) Sawyer, W. H., Frieden, E. H. and Martin, A. C. (1953): *In vitro* inhibition of spontaneous contractions of the rat uterus by relaxin-containing extracts of sow ovaries. Amer. J. Physiology, 172 (3), 547—552.

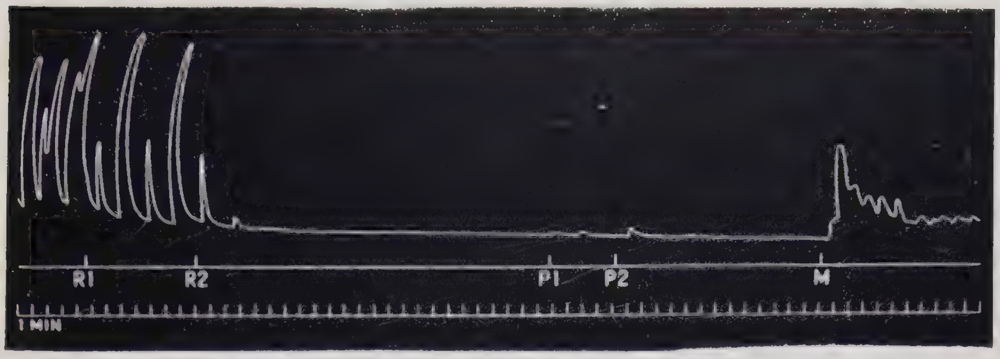
7) Unger, G. (1947): Release of proteolytic enzyme in anaphylactic and pepton shock *in vitro*. Lancet, 1, 708—709.

8) Wada, H. and Yuhara, M. (1956): Inhibitory effect of relaxin preparation upon spontaneous uterine contractions of the rat and the guinea pig *in vitro*. (in Japanese) Sci. Rept. Facul. Agr. Okayama Univ., No. 9. 11 20.

9) 山崎英正 (1954): 細胞からのヒスタミン遊離; 生体の科学, 6 (1), 2—12.

Fig. 1. Effects of relaxin preparation heated and of pepsin preparation upon the motility of the rat uterus *in vitro.*

40 cc. chamber, 37°C.



R1 : 5 GPU of relaxin heated for 30 min. at 100°C.

R2 : 5 GPU of relaxin heated for 1 hr. at 63°C.

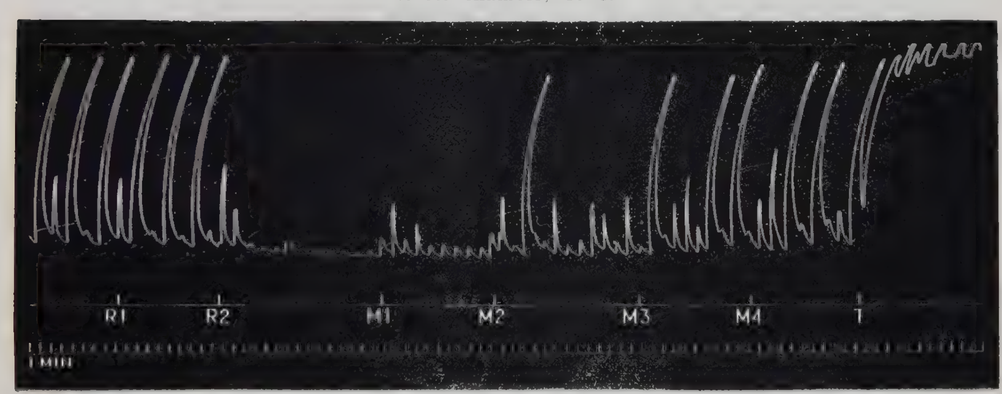
P1 : 6 mg. of pepsin heated for 1 hr. at 63°C.

P2 : 6 mg. of pepsin unheated

M : 1 cc. of muscle exract (4 hrs., 37°C.)

Fig. 2. Showing perfect inactivation of relaxin preparation by heating at 100°C. for 1 hr., and oxytocic effects of trypsin preparation and of muscle extract in the rat uterus *in vitro.*

40 cc. chamber, 37°C.



R1 : 5 GPU of relaxin heated for 1 hr. at 100°C.

R2 : 5 GPU of relaxin unheated

M1 : 1 cc. of muscle extract (4 hrs., 37°C.) heated for 30 min. at 100°C.

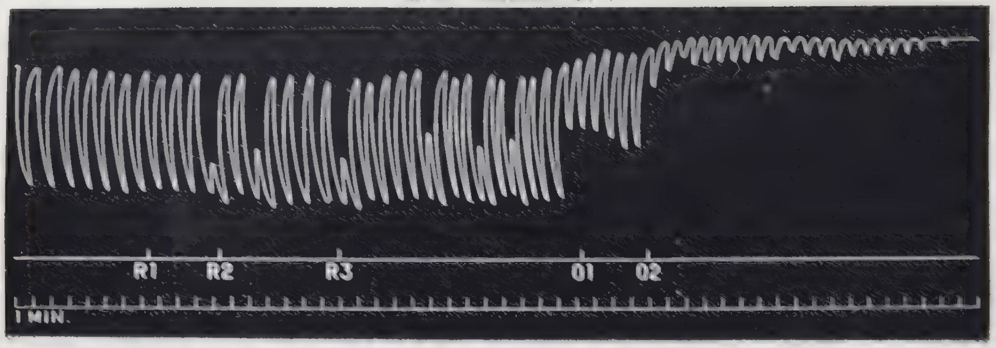
M2 : 1 cc. of muscle extract (4 hrs., 37°C.) heated for 30 min. at 63°C.

M3 : 1 cc. of muscle extract (4 hrs., 0°C.)

M4 : 1 cc. of muscle extract (4 hrs., 37°C.)

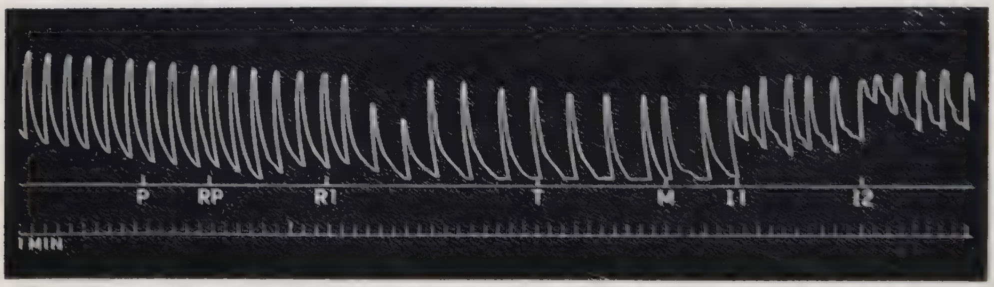
T : 2500 H. U. M. of trypsin preparation

Fig. 3. Effect of oxytocin upon periodic spontaneous motility of the rat uterus which showed scarcely any response to relaxin.
40 cc. chamber, 37°C



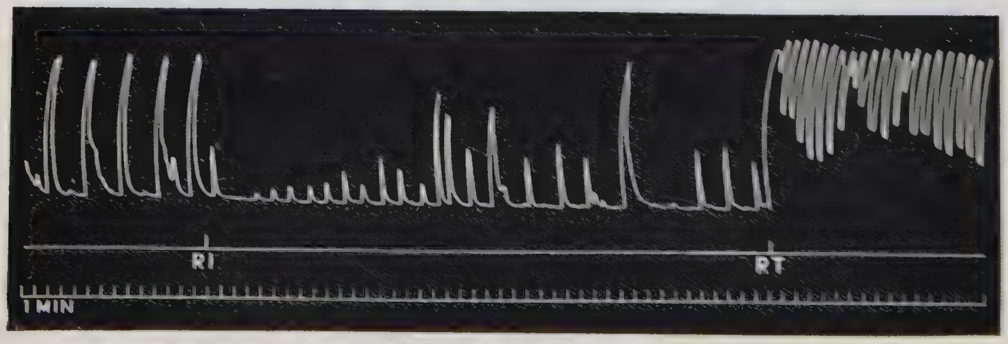
R1 10 GPU of relaxin
R2 10 GPU of relaxin
R3 20 GPU of relaxin
O1 0.003 I.U. of oxytocin
O2 0.003 I.U. of oxytocin

Fig. 4. Showing inactivation of relaxin by digestion with pepsin, preliminary destruction of tryptic activity of trypsin preparation by heating at 100°C, 1 hr., and oxytocic effect of the tissue extract upon the rat uterus in vitro. 40 cc. chamber, 37°C



P : 6 mg. of pepsin
RP : 5 GPU of relaxin + 6 mg. of pepsin, 4 hrs., 37°C
R1 : 5 GPU of relaxin unheated
T : 2500 H.U.M. of trypsin, 1 hr., 100°C
M : 1 cc. of muscle extract (4 hrs., 37°C)
I1 : 1 cc. of tissue extract (4 hrs., 37°C)
I2 : 1 cc. of tissue extract (4 hrs., 37°C)

Fig. 5. In vitro contractions of the rat uterus caused by oxytocic activity of trypsin preparation which was used for digestion of relaxin.
40 cc. chamber, 37°C



R1 : 4 GPU of relaxin RT : 10 GPU of relaxin + 20,000 H.U.M. of trypsin, 37°C, 2 hrs.

コリデール種緬羊の離乳時と満1才時における Fleece Character 間の関係について

[illegible]

Relationship between Weanling and Yearling Fleece Characters in the Corriedale Sheep

Kazuo SUGAI and Hiroshi NAGASAWA

This study has been conducted to test if the yearling fleece characters may be predicted from the weanling fleece characters, by investigating the relationship between the weanling and the yearling fleece characters with special reference to the grease yield, clean yield, clean yield percentage, stretched length, density and the fineness of the Corriedale sheep wool.

The animals used were [illegible] Corriedale ewes born in the spring, [illegible] at the [illegible] Stock Breeding Farm of the Department of Agriculture and Forestry. The wool samples were taken from left and right side and thigh regions of each sheep at weanling and yearling ages and each fleece character at both ages was measured and its relationship was analyzed.

The results obtained were as follows:

(1) Considerably high and significant regressions and correlations were found between weanling and yearling characters, such as the grease wool yield, stretched wool length at side region and the wool fineness at thigh region.

(2) While the clean wool yields, clean wool yields percentages, wool density and the wool fineness at side regions between both ages had no significant regression and correlations.

(3) It seems from the results of the present study that of all fleece characters measured, grease wool yield, stretched wool length at side region and the wool fineness at thigh region have considerably high values for predicting the yearling fleece characters from the weanling characters of the Corriedale sheep.

I 緒　　　言

[illegible] fleece character [illegible] fleece character [illegible] fleece character [illegible] fleece character が，成年の fleece character に対する推定の価値を有するか [illegible] fleece character [illegible]

時のそれとの関係については，米の Lambert, Hardy & Schott[3] (1938) により，コリデール，コロンビヤ及びラムブーイエメリノの3品種について，予備的研究が実施せられ，次いで Pohle[4] (1942) により，上記3品種の緬羊について，両時期における fleece character 間の関係が調査されている．なお Blunn & Grandstaff[1] (1945) は，各種の交雑緬羊の離乳時と満1才時における羊毛の歩留の関係を連続5ケ年に亙り，調査している．

コリデール種緬羊の離乳時と満1才時における fleece character 間の関係については，上述の如き研究がみられるが，劣悪な fleece character の改良を必要とする日本のコリデール種緬羊については，一般に未だ牡羊の後代検定は行われず，かゝる研究は実施されていない．将来実施さるべき牡羊の後代検定並びに fleece character の面からの緬羊の selection の基礎資料を得るために，かゝる研究が重要視される．従つて本研究は，日本コリデール種緬羊につき，仔羊の離乳時の fleece character によつて満1才時の fleece character を推定し得るや否やを知るために，両時期における fleece character 中，経済的に重視される直線毛長，羊毛の歩留，羊毛の密度及び羊毛の繊度間の関係を調査したものである．

II　実験の材料と方法

供試緬羊は，すべて農林省中国種畜牧場において，1955年春季に生産せられたコリデール種牝緬羊11頭である．これらの緬羊は，何れも，放牧を行い，栄養状態は，良好であり，普通の発育を示したものである．離乳は，緬羊の生後約3ケ月半～4ケ月半に実施し，羊毛サンプルは，緬羊の離乳時及び満1才時（緬羊の生後約13ケ月～14ケ月）の2回採取した．これら緬羊の生年月日，離乳年月日及び羊毛採取年月日を示せば，Table 1の通りである．離乳時には，羊体左側 side の中央部，満1才時には，右側 side の中央部の一定面積 ($20cm^2$) より，電気剪毛器を以て，出来得る限り，皮膚に近接して，羊毛を切除し，採取した羊毛サンプルにつき，各々その汚毛量 (grease wool yield)，純毛量 (clean wool yield)，羊毛の歩留 (clean wool yield percentage)，直線毛長 (stretched wool length)，羊毛の密度 (wool density) 及び羊毛の繊度 (wool fineness)を測定した．

Table 1.　Birth, weaning and wool sampling dates of the sheeps examined

Sheep No.	Birth date	Weaning date	Wool sampling date	
			1st sampling	2nd sampling
C55— 5	19. ii . 55	5. Vii. 55	1. Vii. 55	13. iV. 56
〃 6	19. ii . 55	〃	〃	〃
〃 7	19. ii . 55	〃	〃	〃
〃 10	21. ii . 55	〃	〃	〃
〃 16	23. ii . 55	〃	〃	〃
〃 20	27. ii . 55	〃	〃	〃
〃 35	3. iii. 55	〃	〃	〃
〃 37	3. iii. 55	〃	〃	〃
〃 42	4. iii. 55	〃	〃	〃
〃 53	15. iii. 55	〃	〃	〃
〃 60	18. iii. 55	〃	〃	〃

汚毛量については，各羊毛サンプルを 25°C，相対湿度65%の恒温恒湿器中に8時間放置した後取出し，直ちにこれを秤量した．

純毛量については，grease, suint 及び dirt を除去した各羊毛サンプルを 100°C の定温乾燥器中で，8時間乾燥した後，取出して直ちにこれを秤量した．

羊毛の歩留は，各羊毛サンプルの純毛量の汚毛量に対する100分率を以て示した．

直線毛長については，各羊毛サンプルから任意に羊毛繊維を50本宛抜き取り，鋭利なピンセッ

トにより，各羊毛繊維を直線状に伸長した場合の長さを測定し，50本の平均値を求めた．

羊毛の密度は，皮膚の単位面積当りの羊毛繊維の数と皮膚の単位容積当りのステープルの重量との両者を以て示し，前者は，各羊毛サンプルの単位面積（$1cm^2$）当りの純毛量（mg）を求め，これをそのサンプル中の500本の羊毛繊維の純毛量で除したものに500を乗じたものを以て表わし，後者は，Hardy[2]（1934）の方法により，羊毛サンプルの単位面積 $1cm^2$ 当りの純毛量（mg）を，そのサンプルの直線毛長（cm）で除し，直線状に伸長したステープル1cc当りの純毛量を以て示した．

羊毛の繊度については，羊体 side の中央部及び腿の2部位について測定し，各部位の羊毛サンプルから，任意に羊毛繊維を50本宛抜き取り，これをエチルエーテル中で洗滌し，乾燥した後，各羊毛繊維の略々中央部の直径（μ）を測定し，50本の平均値を算出した．

Ⅲ　実験の成績と考察

供試緬羊につき測定した各 fleece character の離乳時と満1才時における数値を示し，両時期における各 fleece character 間の関係を検討すれば，次の通りである．

(1) 汚毛量，純毛量及び羊毛の歩留間の関係

各供試緬羊の離乳時及び満1才時の side における皮膚 $20cm^2$ 当りの汚毛量，純毛量及び羊毛の歩留を示せば，Table 2の通りである．本表により，満1才時の汚毛量（Y）の離乳時の汚毛量（X）に対する回帰（$\hat{Y}$），及び両時期における汚毛量間の相関係数を算出すれば，$\hat{Y}=3.29+1.33X$，$r=+0.72$ となり，回帰係数及び相関係数は共に，t 検定により，5％水準において，有意の値を示し，相関係数は，かなり高い．

Table 2.　Grease wool yield, clean wool yield and clean wool yield percentage at weanling and yearling ages

Sheep No.	Grease wool yield (g per $20cm^2$)		Clean wool yield (g per $20cm^2$)		Clean wool yield percentage(%)	
	weanling (X)	yearling (Y)	weanling (X)	yearling (Y)	weanling (X)	yearling (Y)
5	—	—	3.48	4.74	—	—
6	—	—	2.56	6.30	—	—
7	—	—	4.23	5.84	—	—
10	4.99	10.95	3.19	5.30	63.82	48.40
16	6.28	12.21	4.47	6.62	71.21	54.23
20	5.35	9.63	3.32	4.52	61.98	46.94
35	5.89	10.93	3.88	4.87	65.82	44.53
37	5.55	8.54	3.64	4.82	65.62	56.40
42	6.14	12.16	3.92	6.11	63.83	50.23
53	3.97	8.95	2.60	4.61	65.64	51.45
60	6.33	12.06	4.28	6.48	67.56	53.70
Mean	5.56±0.66	10.68±1.24	3.60±0.43	5.47±0.44	65.69±2.34	50.74±3.38

満1才時の純毛量（Y）の離乳時の純毛量（X）に対する回帰（$\hat{Y}$）及び両時期における純毛量間の相関係数は，$\hat{Y}=4.41+0.57X$，$r=+0.46$ を示し，回帰係数及び相関係数は共に，t 検定により，5%水準において有意性を示さない．次に満1才時の羊毛の歩留（Y）の離乳時の歩留（X）に対する回帰（$\hat{Y}$）及び両時期における歩留間の相関係数を示すと，$\hat{Y}=-1.16+0.79X$，$r=+0.55$ となるが，純毛量の場合と同様に，回帰係数，相関係数は共に有意の値を示さない．

即ち本試験の結果からは，汚毛量，純毛量及び歩留の中，汚毛量のみが，かなり高い推定価値を有するものゝ如くである．然し歩留については，Lambert et al.[3] (1938) 及び Pohle[4] (1942) は，有意の，かなり高い相関係数を得，本試験の成績と相反する結果を示しており，後述の如く，歩留の関係については，更に検討を要するものと思われる．各供試緬羊の満1才時の歩留は，すべて離乳時の歩留よりも，かなり低い値を示しているが，これは，離乳後の純毛量の増加に比し，suint, dirt, grease 等の増量が著しかつた結果に基くものと考えられる．

(2) 直線毛長の関係

各供試緬羊の離乳時及び満1才時における羊毛繊維50本宛の直線毛長の平均値を示せば，Table 3の通りである．本表より満1才時の直線毛長（Y）の離乳時の直線毛長（X）に対する回帰（Ŷ）を求めれば，Ŷ＝7.84＋1.50X，となり，回帰係数は，t 検定により，5％水準において有意性を示し，又両時期における直線毛長間の相関係数（r＝＋0.73）も，有意の，かなり高い値を示す．本相関係数は，Lambert et al.[3] (1938) 及び Pohle[4] (1942) が，両時期における，コリデール種緬羊のステープル長について得た有意の相関係数よりも，稍々高い値を示している．本成績並びに上記両者の成績より考察すると，離乳時の（直線）毛長から，満1才時の（直線）毛長を推定する場合の信頼度は，かなり高いものゝ如く思われる．

Table 3. Stretched length of wool at weanling and yearling ages

Sheep No.	Stretched length of wool (cm)	
	weanling (X)	yearling (Y)
5	8.05	18.38
6	7.32	19.96
7	9.19	23.66
10	8.94	21.69
16	9.52	21.74
20	8.48	20.23
35	7.74	20.41
37	8.55	20.93
42	8.67	19.38
53	6.87	18.44
60	7.82	18.28
Mean	8.29±0.54	20.28±1.22

(3) 羊毛の密度の関係

羊毛の密度は，(a) 皮膚の 1cm² 当りの羊毛繊維の数及び (b) 直線状に伸長したステープル 1cc 当りの純毛量の mg 数の両者を以て示したが，(a), (b) 両者につき各供試緬羊の離乳時及び満1才時における羊毛の密度を示せば，Table 4の通りである．

Table 4. Wool density at weanling and yearling ages

Sheep No.	(a) Number of wool fiber per cm²		(b) mg of clean wool per cc of staple of stretched length	
	weanling (X)	yearling (Y)	weanling (X)	yearling (Y)
5	2572	1465	21.58	12.90
6	2472	2755	17.49	15.79
7	2336	1712	23.03	12.35
10	2630	2097	17.83	12.22
16	2741	2148	23.49	15.23
20	2632	1365	19.55	11.17
35	3877	1704	25.05	11.92
37	2749	1455	21.29	11.51
42	2432	2339	22.60	15.76
53	2199	1708	18.95	12.49
60	3143	2562	27.33	17.75
Mean	2708±309	1937±317	21.65±5.04	13.55±5.15

本表により，満1才時の羊毛の密度（Y）の離乳時の密度（X）に対する回帰（Ŷ）及び両時期における密度間の相関係数（r）を計算すれば，(a) の場合においては，Ŷ＝38.205−0.01X，r＝＋0.01，(b) の場合においては，Ŷ＝12.68＋0.04X，r＝＋0.04となり，(a), (b) 何れの場合においても，t 検定

により，5%水準で，回帰係数及び相関係数は，有意の値を示さない．両時期におけるステープル 1cc 当りの純毛量（centigram）で示した密度間につき，Lambert et al.[3]（1938）及び Pohle[4]（1942）は，有意ではあるが，甚だ低い相関係数を得ており，これらの結果を綜合して考察すると，離乳時の羊毛の密度は，満1才時の密度に対する推定の価値を殆んど有しないものゝ如く考えられる．各供試緬羊の満1才時の羊毛の密度は，1頭を除き，他は何れも，離乳時の密度よりも，かなり低い値を示すが，これは，離乳後の緬羊の皮膚の膨脹に起因するものと思われる．

(4)　羊毛の繊度間の関係

各供試緬羊の離乳時及び満1才時における side，thigh 両部位の羊毛の繊度の平均値を示せば，Table 5の通りである．本表により，満1才時の羊毛の繊度（Y）の離乳時の繊度（X）に対する回帰（Y）及び両時期における繊度間の相関係数を求めれば，side の場合においては，$Y = 0.53 + 0.09X$，$r = +0.12$，thigh の場合においては，$\hat{Y} = 4.14 + 0.81X$，$r = +0.68$ となり，回帰係数及び相関係数は，side の場合においては，t 検定により，5%水準において，有意の値を示さないが，thigh の場合においては，有意の値を示し，相関の限度は，かなり高い．本試験の結果からみると，thigh の部位においては，離乳時の羊毛の繊度から，満1才時の羊毛繊度を推定することが出来る様に思われる．なお各供試緬羊につき，離乳時と満1才時における繊度を比較すると，side，thigh の両部位共に，その差は僅かであるが，満1才時の繊度は，一般に離乳時のそれに比し，小さい値を

Table 5. Wool fineness at weanling and yearling ages (in micron)

Sheep No.	Side weanling (X)	Side yearling (Y)	Thigh weanling (X)	Thigh yearling (Y)
5	31.00	31.73	36.33	34.00
6	29.93	27.20	35.00	32.47
7	30.33	29.87	31.40	31.13
10	28.00	24.27	32.53	31.87
16	29.80	27.67	30.27	27.47
20	29.33	31.53	34.27	33.93
35	30.67	29.67	27.53	27.75
37	32.87	29.60	31.80	28.41
42	36.13	28.93	30.60	30.20
53	35.47	30.60	31.80	32.73
60	36.93	26.73	32.00	25.43
Mean	31.86±2.04	28.89±1.51	32.14±1.62	30.49±1.92

Table 6. Relationships between weanling and yearling fleece characters

Characters	Number of animals	Mean weanling	Mean yearling	Correlation coefficient (r)	Regression coefficient (b)
Length (cm)	11	8.29±0.54	20.28±1.22	0.73	1.50
Grease wool yield (g per 20cm²)	8	5.56±0.66	10.68±1.24	0.72	1.33
Clean wool yield (g per 20cm²)	11	3.60±0.43	5.47±0.44	0.46*	0.57
Clean wool yield percentage (%)	8	65.69±2.34	50.74±3.38	0.55*	0.79
Density: No. of wool fibers per cm²	11	2708±309	1937±317	−0.01*	−0.01
Density: mg per cc [1]	11	21.65±5.04	13.55±5.15	0.04*	0.04
Fineness: side (μ)	11	31.86±2.04	28.89±1.51	0.12*	0.09
Fineness: thigh (μ)	11	32.14±1.62	30.49±1.92	0.68	0.81

[1] miligrams of clean wool per cc of staple of stretched length
* insignificant at 5% level

示している.

Table 1 〜Table 5 により，供試緬羊の離乳時と満1才時における各 fleece character 測定の平均値，相関係数及び満1才時の fleece character の離乳時の fleece character に対する回帰係数を一括表示すれば，Table 6 の通りである.

上述の如く，本研究による成績は，毛長間の関係については，Lambert et al.[3] (1938) 及び Pohle[4] (1942) が，コリデール種緬羊について得た成績と一致を示し，歩留，密度及び繊度間の関係については，一致をみていない.

かゝる成績の差異は，諸種の条件，就中環境条件の差異に基くものとも考えられるが，本研究に用いた緬羊頭数が少かつたことにもよるものと思われ，正確なる結論を得るためには，更に多数の動物による調査研究が必要である．又 Blunn aud Grandstaff[1] (1945) は，雑種緬羊の side の部位の離乳時と満1才時における羊毛の歩留間の関係を連続5ケ年に亘り比較し，満1才時の羊毛の歩留には，離乳時より満1才時に至る期間の環境条件の影響が大であり，両時期における羊毛の歩留の関係を更に長期に亙つて調査する必要があるとしているが，両時期における fleece character 間の関係については，1ケ年のみでなく，更に多年に亙る調査研究を必要とするものと考察される.

Ⅳ 総　　括

本研究は，コリデール種緬羊の離乳時と満1才時における fleece character 特に汚毛量，純毛量，歩留，直線毛長，密度，及び繊度間の関係を調べ，離乳時における fleece character から，満1才時の fleece character を推定することが出来るかどうかを知るために実施したものである．供試動物は，農林省中国種畜牧場において，1955年春季に生産されたコリデール種牝緬羊11頭であり，各緬羊の離乳時及び満1才時において，羊体の左側と右側の side 及び thigh から，羊毛サンプルを採取し，両時期における fleece character を測定し，両者の関係を調査した．得られた結果を要約すると次の通りである.

(1) 離乳時と満1才時における side の汚毛量，直線毛長及び thigh の繊度間には，かなり高い，有意の回帰並びに相関々係が見られた.

(2) side の純毛量，歩留，密度及び繊度間には，有意の回帰並びに相関々係は見出されなかつた.

(3) コリデール種緬羊の離乳時の fleece character から，満1才時の fleece character を推定する場合，fleece character の中 side における汚毛量，毛長及び thigh における繊度は，かなり高い推定の価値を有するものゝ如く思われる.

本研究実施に当り，供試羊毛の提供にあづかつた農林省中国種畜牧場仙波喬場長，並に羊毛採取に御協力をいたゞいた同場松崎格技官に感謝の意を表する次第である．なお本研究は，日本緬羊協会の委託を受けて行つたものであることを附記する.

引　用　文　献

1) Blunn, C.T. and J.O. Grandstaff, (1945): Comparison of the yields of side samples from weanling and yearling sheep. Jour. Anim. Sci., 4, 122.

2) Hardy, J.I. (1934): Wool yield and fleece density can be measured by a simplified method. U.S.D.A. yearbook, 378.

3) Lambert, W.V., J.I. Hardy and R.G. Schott, (1938): A. preliminary study of the relation

between the fleece characteristics of weanling and yearling sheep. Amer. Soc. Anim. Pro., Prod., 298.
4) Pohle, E. M. (1942): Relationship between weanling and yearling fleece characters in range sheep. Jour. Anim. Sci., 1, 229.

薄荷種子の発芽促進に関する研究* 第1報

池 田 長 守 ・ 中 村　 勝

Effects of various treatments on the germination of mint seeds I

Nagamori IKEDA and Masaru NAKAMURA

It is well known that the newly harvested mint seeds fail to germinate and this arrested germination continues until at least five months after harvest, if the seeds are preserved in dry condition before germination test. The inducement of germination seems to be very important from the view-point of genetics and plant breeding, though rhizomes are generally used for the commercial propagation of mint. The authors carried out some experiments in order to improve the method of mint seed germination. Causes of the poor germination were also researched for. The results are summarized as follows:

(1) Preservation for about five months under moist low-temperature condition proved to be very effective in inducing germination (table 1).

(2) Daily alternations of temperature, especially of 15°C for 16～20 hours and 30°C for 8～4 hours, brought about a better germination than when the constant temperatures were applied (table 2, 3).

(3) Germination percentage on the germinator moistened with dilute solution (0.005～0.01 Normal) of H_2SO_4 and KNO_3 was higher than that obtained with distilled water (table 4).

The cause of the poor germination of the freshly harvested mint seeds appears to be ascribable to dormancy, the circumstances that the after-ripening of embryo is not yet completed, because they respond to the preservation under moist low-temperature condition. It remains unknown, however, whether the impermeability of seed coat plays a role in the arrested germination of mint seeds (table 5).

I 緒　　言

薄荷の増殖には地下茎を用い通常種子繁殖を行わない．併し遺伝学並びに育種学上の立場では新しい遺伝子型育成のために種子繁殖を行う必要がある．然るに薄荷種子の発芽は非常に不良で屢々研究に支障を来す．よつて筆者等は発芽促進法を見出し，あわせて発芽不良の原因を解明しようとして本実験を行つた．実験にあたつて種々適切な助言を与えられた岡山大学教育学部小河原公司氏に謹んで謝意を表する．

II 実　験　方　法

10月に採種した日本薄荷「三美」の種子を後述の方法で貯蔵した．発芽試験は径 9cm のシャ

* 本研究要旨は昭和31年4月9日日本作物学会第111回講演会において発表．

ーレに約25gの洗浄砂を入れ，濾紙を敷き，約12ccの蒸溜水を加えてこれを湿し，その上に前記貯蔵種子を置いて行つた．一区50粒，4回反復，毎日午前9時に発芽の調査を行い，16日で終了した．発芽床における変温処理は，それぞれの温度に予め調節した恒温器を準備して，発芽床を一つの恒温器から他に移動し，温度の変化を急激ならしめた．

Ⅲ 実 験 結 果

1) 湿潤低温前処理

種子を湿潤低温状態で積層貯蔵しておくことが発芽促進に有効であることが知られている．よつて先ず此の前処理（種子を布袋に包み，湿つた砂の中に入れて0°～5°Cに保つた）の影響を見た．普通風乾種子を25°Cの恒温及び室温で貯蔵して比較として用いた．その結果は第1表に示す如く，25°C及び室温で貯蔵した種子は，20°C及び室温における発芽試験では全期を通じて発芽が見られなかつた．25°Cの発芽試験では翌年3月（150日貯蔵）に至つて始めて発芽を見た．温変（20°C 16時間，30°C 8時間とする1日週期）下の発芽試験ではそれぞれ若干の発芽を見たが，その率は非常に低かつた．之に対して湿潤低温積層貯蔵種子は，20°C及び25°Cの恒温並びに室温における発芽試験では，貯蔵後期には可なりの発芽を示すようになり，更に変温下の発芽試験においては，積層期間が延長するに従つて発芽歩合が著しく高くなつた．更に翌年3月（第1表最後の発芽試験期）には積層貯蔵中に若干種子の発芽を見るに至つた．この結果から湿潤低温積層貯蔵が薄荷種子の発芽促進に有効であることが明らかとなつた．

Table 1. Effect of Moist Low-Temperature Pretreatment on the germination of mint seeds.

Storage method	Duration of storage (days)	Germination temps. / Date of sowing	Germination (%)			
			20°～30°C *	20°C	25°C	room temp.
Moist low-temperature storage	7	30. Oct. '53	22.0	0	0	0
	38	1. Dec. 〃	14.0	0	0	0
	75	6. Jan. '54	29.5	3.5	0	0
	114	14. Feb. 〃	26.0	7.5	0	0
	150**	22. Mar. 〃	50.0	16.5	35.2	15.0
Dry storage at 25°C	7	30. Oct. '53	2.0	0	0	0
	38	1. Dec. 〃	3.5	0	0	0
	75	6. Jan. '54	11.0	0	0	0
	114	14. Feb. 〃	2.0	0	0	0
	150	22. Mar. 〃	0	0	18.0	0
Dry storage at room temp.	7	30. Oct. '53	6.0	0	0	0
	38	1. Dec. 〃	5.0	0	0	0
	75	6. Jan. '54	7.0	0	0	0
	114	14. Feb. 〃	1.0	0	0	0
	150	22. Mar. 〃	2.5	0	26.4	0

Note : * Daily alternations of temp. Seeds were kept at the lower temp. for 16 hours and at the higher one for 8 hours.　** A few seeds germinated during the storage.

2) 変温処理

第1表に示した発芽試験でも変温の発芽促進効果は認められる．本実験では日々高温持続8時

Table 2. Effect of daily alternating temperatures on the germination of mint seeds.

Kinds of alternating temps.	Difference bet. max. and min.	Germination %
20°C	—	0
25°C	—	0
15° ～ 20°C	5°C	0
20° ～ 25°C	〃	0
25° ～ 30°C	〃	0
15° ～ 25°C	10°C	5.0
20° ～ 30°C	〃	3.5
15° ～ 30°C	15°C	23.5

Note: Air-dried seeds were placed on the blotting paper moistened with distilled water on the 30th Nov. 1953. Seeds were kept at the lower temp. for 16 hours and at the higher one for 8 hours each day, when the alternating temperatures were applied.

間，低温持続16時間とし，温度の組合せを種々変更して効果の相違を見た．なお標準として20°C及び25°Cの恒温を用いた．第2表はその結果を示したもので，この時期（11月末，採種後1ケ月）の室内風乾種子では5°Cの温度較差は発芽促進に効果なく，10°Cの較差で漸く効果が認められ，15°Cの較差では著しく効果のあることがわかつた*．次に第2表に示した発芽実験で最効果のあつた低温15°C，高温30°C（温度較差15°C）をとり，1昼夜間の低温，高温持続時間を種々変えて見た．その結果は第3表に示す如くであつた．本表によると1昼夜の低温持続中1時間だけ高温に保つか，或は1昼夜の高温持続中4時間だけ低温に保つことによつて，始めて多量の発芽促進効果が見られる．即ち高温4～8時間，低温20～16時間持続した場合に発芽が最促

* 第2表に示した成績を分散分析した結果，処理の相違による発芽率の差異は有意となつた．よつてこれを2群に分ち，温度差15°C区を第1群とし，他を第2群として不偏分散を求め，誤差と比較したところ，群間の発芽率の差は有意となつた．次に第2群内における発芽率の相違も有意であるから，更に之を2群に分ち，温度較差5°Cのものを第2.1群，温度較差10°Cのものを第2.2群，とした．その不偏分散を誤差と比較した結果は次表F値に示す如く，群内の発芽率の差異は共に有意と認められず，群間の発芽率の差異は有意と認められた．よつて本文に述べた如き結論に達した．

分散分析表（第2表の実験）

要　因	偏差平方和	自由度	不偏分散	F
区	14.1211	3	4.7070	
処　理	2,995.8644	7	427.9806	33.84 **
（第2群内	（691.3398	（6	（115.2233	9.11 **
群　間	2,304.5246	1	2,304.5246	182.19 **
誤　差	265.6237	21	12.6487	
全　体	3,275.6092	31		

分散分析表（第2表の実験より）

要　因	偏差平方和	自由度	不偏分散	F
第2.1群内	0.0	4	0.0	—
第2.2群内	25.1340	1	25.1340	1.99
群　間	666.2058	1	666.2058	52.67 **
誤　差	265.6237	21	12.6487	

進されることがわかる（脚註＊）．

Table 3. Effect on the germination of mint seeds of the daily alternating temperatures of 15°～30°C, in which the duration of high and low temperatures were varied.

Duration in hour		Germination	Duration in hour		Germination	Duration in hour		Germination
30°C	15°C	%	30°C	15°C	%	30°C	15°C	%
0	24	1.5	6	18	32.8 *	16	8	27.6 *
0.5	23.5	1.0	8	16	41.0 *	18	6	6.1 *
1	23	12.5 *	10	14	16.5 *	20	4	7.0 *
2	22	28.3 *	12	12	38.2 *	22	2	1.5
4	20	43.1 *	14	10	37.4 *	24	0	0

Note : Germination tests were made on the 26 th. Feb. 1954, with air-dried seeds. When tested by means of analysis of variance, alternation of temperature is proved to be effective (at 1% level) for raising the percentage of germination in the classes on which * is attached.

＊第3表に示した成績を分散分析した結果，処理の相違（高温，低温持続時間の変更）による発芽率の相違は有意となつた．よつて之を2群に分ち，高温持続時間 0，0.5，22，24 の区（恒温及び之に近い区）を第1群とし，他を第2群（変温区）として，その不偏分散を求め誤差と比較した．その結果は下記分散分析表に示す如く，第1群では群内の発芽率の差異の有意性は認められず（即ち第1群内の恒温区と変温区，又高温区と低温区の発芽率にちがいがあるかどうかは明らかでない），且第1，第2両群間の発芽率の相違は有意

分散分析表（第3表の実験）

要因	偏差平方和	自由度	不偏分散	F
区	225.9770	3	75.3257	4.34 **
処理	12,214.6531	14	872.4752	50.28 **
第1群内	77.1415	3	25.7138	1.48
第2群内	3,992.9371	10	399.2937	23.01 **
群間	8,144.5744	1	8,144.5744	469.37 **
誤差	728.7905	42	17.3522	
全体	13,169.4206	59		

となつた．又第2群内における発芽率の相違も有意であるから，更に之を2群に分けて，第2.1群は高温持続4，6，8時間区，第2.2群は残りの8区とし，その不偏分散を求め誤差と比較した．その結果群間の発芽率の

分散分析表（第3表の実験より）

要因	偏差平方和	自由度	不偏分散	F
第2.1群内	82.0384	2	41.0192	2.36
第2.2群内	2,631.2241	7	375.8892	21.66 **
群間	1,279.6746	1	1,279.6747	73.75 **
誤差	728.7905	42	17.3522	

相違は有意で，第2.1群に属する3区の発芽率は，残り8区の発芽率とは別の範疇に属するものと考えられる．以上により本文に述べた如き結論に達した．

3） 化学薬品処理

化学薬品の発芽促進効果を知るために，室温で風乾貯蔵した種子を0.005～0.01規定の極稀薄なチオ尿素，硫酸或いは硝酸加里溶液で湿した発芽床で発芽試験を行つて無処理（蒸溜水使用）区と比較した．その結果，硫酸及び硝酸加里の稀薄溶液が発芽促進に有効であることが明らかとなつた．併しチオ尿素は促進効果を示さなかつた（第4表）．

Table 4. Effects of certain chemicals on the germination of mint seeds.

Chemicals	Concentration in N.	Germination %
NH_2CSNH_2	0.01	13.0
〃	0.005	7.0
H_2SO_4	0.01	44.5 *
〃	0.005	11.0
KNO_3	0.01	47.5 *
〃	0.005	57.5 *
Dist. water	—	15.5

Note : On the 11th of Jan. 1954, air-dried seeds were placed on the germinator under the condition of daily alternating temperatures of 30°C for 8 hours and 15°C for 16 hours.
* The favorable effects of chemicals are significant at 1% level.

4） 種皮の擦傷処理

室温で風乾した種子の表皮を，サンドペイパーで摺るか或いは種子を細砂と共にかきまぜて表皮に擦傷を与え，その発芽に及ぼす影響を見た．その結果は第5表に示す如く，処理区は無処理区に対し発芽率は若干高いが，その差は有意でなく，擦傷処理の発芽促進効果は明らかでなかつた．

Table 5. Effect of mechanical scarification of seed coat on the germination of mint seeds.

Treatment	Germination %
Rubbed in a mortar together with sand	35.0
Rubbed on sand paper	36.7
Intact	29.8

Note : On the 18th March 1954, air-dried seeds were scratched on the seed coat and placed on germinator and were kept under the same condition of alternating temperatures as in the table 4. Differences of germination among treatments are insignificant at 5% level.

Ⅳ 考　　察

新に採種した種子が発芽しない場合，これを促進するために湿潤な媒質，例えば川砂等の中に種子を入れて，0°～10°C の低温中に貯蔵する発芽前処理は最も広く用いられる方法である．湿潤低温積層によつて胚の後熟が促進されると休眠が破れて，種子は好条件の下に移されるや直ちに発芽を始めるようになる．従つてこの前処理に反応する種子の多くは不発芽の原因を胚の休眠に帰せられる．尤もその他に胚の休眠と種皮の水分不透過（硬実）との協同作用による場合もある（Crocker and Barton, 1953[1]）．薄荷種子も本研究の結果，5カ月内外の湿潤低温処理によつて，可なり高い発芽率を示すことが明らかとなつた．従つて薄荷種子の発芽不良の原因の少くとも一部は，胚の未後熟による休眠に帰せられると解することが出来よう．次に種皮の水分不透過による発芽不良については，機械的処理による種皮の擦傷，濃硫酸処理，アルコール浸漬，熱湯処理等によつて克服し得る多くの例が知られている．本実験においては種皮の擦傷処理を行つたが，その効果は不明で，薄荷種子の発芽不良に種皮の水分不透過性が関係しているかどうかわからなかつた．なお擦傷処理による胚の

被害も考えられるのでこの点については一層の研究を必要とする.

自然状態で種子が発芽する際, その温度は一定ではないという理由から, 恒温下で種子が発芽し難い場合, 屢々一日を週期とする変温下で発芽試験が行われる. HARRINGTON (1923)[4] はこの条件の下で花卉, 禾本科の牧草, 蔬菜等多種類の種子の発芽促進に成功した. GASSNER (1930)[3] は変温が発芽促進に有効であるための条件として, (1). 高温と低温との温度較差が大きく, (2). 毎日, 高温よりも低温に長く置く事をあげているが, 薄荷種子の場合にも, この2つの条件を充たす変温下で最高の発芽率が得られた. 変温下で種子の発芽を促進させようとする場合, 適用さるべき高低両種温度中一方が極端に短い時には変温の効果は当然現われない. 変温効果の現われる最小限度として, 本実験では, 低温 (15°C) 中に高温 (30°C) を挿入する場合は毎日高温1時間, 高温中に低温を挿入する場合には毎日低温4時間をそれぞれ与えている. 此の時間は植物によつて, 又種々の他の条件によつて多少の相違はあるとしても, 温度が発芽生理に影響を与えるに必要な最短時間を示すものと考えることが出来よう.

種子の化学薬品処理には種々の方法がある. うち稀薄溶液で湿した発芽床上で発芽させる方法は極めて有効とされる. THOMPSON 及び KOSAR (1938)[8] はレタス種子の発芽に及ぼすチオ尿素の効果を述べ, OTTENWAELDER (1914)[5] は酸の発芽促進効果を強調し, 又 GASSNER (1915)[2] は硝酸加里が好光種子の発芽を著しく促進することを見出した. 滝口 (1930) もタデ[6], シソ[7] 種子の発芽に硝酸加里が有効であると報告している. 筆者等の実験においても硫酸及び硝酸加里の稀薄溶液が有効であることが認められた. 併し本実験の範囲では, これら化学薬品による発芽促進機構にふれることは出来ない.

本実験の結果は, 実際に薄荷種子の高い発芽歩合を得るためには (1). 湿潤低温積層前処理 (2). 発芽時の変温 (3). 硫酸或いは硝酸加里の稀薄溶液上での発芽が有効であることを示している. 併し更に発芽率を高めるための方法については今後の研究にまたなければならない.

V 摘　　要

日本薄荷種子の発芽促進方法と発芽不良の原因を知るために若干の実験を行つた. その結果, 高い発芽歩合を得るためには(1). 採集した種子を湿潤低温の状態で約5ケ月間貯蔵しておくこと (2). 発芽を変温下 (30°C, 4～8時間, 15°C, 20～16時間) において行わしむること (3). 硫酸或いは硝酸加里の 0.005～0.01 規定の稀薄溶液で湿した発芽床上で発芽せしむることが有効であることがわかつた. 湿潤低温貯蔵によつて薄荷種子の発芽が促進せられるという事実から, 本種子の発芽不良 (少くともその一部) は胚の未後熟による休眠に原因するものと推定される. 種皮の水分不透過が発芽不良に関与するか否かについては, 的確なる証明を得るに至らなかつた.

引　用　文　献

1) CROCKER, W. and L. V. BARTON, (1953): Physiology of seed. Waltham.

2) GASSNER, G. (1915): Ueber die keimungsauslösende Wirkung der Stickstoffsalze auf lichtempfindliche Samen. Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. **55**: 259～342.

3) GASSNER, G. (1930): Untersuchungen über die Wirkung von Temperatur und Temperaturkombination auf die Keimung von *Poa pratensis* und anderen *Poa* Arten. Zeit. f. Bot., Bd. **23**: 767～836.

4) HARRINGTON, G. T. (1923): Use of alternating temperatures in the germination of seeds. Jour. Agric. Res., Vol. **23**: 295～332.

5) OTTENWAELDER, A. (1914): Lichtintensität und Substrat bei der Lichtkeimung. Zeit. f.

Bot., Bd. 6 : 785～846.

6）滝口義資（1930）： タデ種子の発芽について，日本作物学会紀事，第2巻： 195～198.

7）滝口義資（1930）： シソ種子の発芽について，日本作物学会紀事，第2巻： 199～200.

8）THOMPSON, R. C. and W. F. KOSAR, (1938)： The germination of lettuce seed stimulated by chemical treatment. Science, 87 : 218～219.

Column 分配 Chromatography による直鎖揮発性脂肪酸の定量について

堀　慧・田辺　昭

Quantitative estimation of the straight chain volatile fatty acids by the column Partition chromatography

Satoshi HORI and Akira TANABE

In 1948 PETERSON and JOHNSON minutely described the column partition chromatographic method for the separation and quantitative estimation of the volatile fatty acids.

In this experiment the partition chromatograms we employed were prepared as follows.

The column was consisted of glass tube packed with silica gel, 30 cm in length and 8mm in diameter. Water was used as stational phase and benzene, 1.2% butanol benzene, 5% butanol chloroform, 12% butanol chloroform and butanol as mobile phase.

Recoveries of formic, acetic, propionic and butyric acid were 104%, 101%, 99%, and 100% respectively.

We tried in vain to estimate the valeric acid in the presence of the acids previously described.

I 緒　言

著者等[1]は向流分散法によりエンシレージ中の揮発性脂肪酸（以下 V. F. As. と略称する）の定量を行つたが，この場合，含まれている酸が一種類であるか又は butyric a. と acetic a. である時はその量を正確に定量し得たが，この両酸に加えて propionic a. が含まれている時は，定量の正確度は可なり低下した．

Column を使用する分配 Chromatography による V. F. As. の分離定量はすでに多くの研究者によつて実施されている．即ち LESTER-SMITH[2] は silica gel を用い butanol を１％含んだ chloroform を展開剤として formic a. から valeric a. にいたる V. F. As. を分離定量した．又 ELSDEN[3] は LESTER-SMITH の方法に準拠し chloroform に1—5%の butanol を含ませたものを展開剤として使用して良結果を得ている．RAMSEY & PATTERSON[4] 及び NIJKAMP も同じ様な報告を行つている．これらの方法はいづれも固定層を保持させた silica gel に標示薬を含ませて呈色させるいわゆる標示薬法である．しかるに1948年 PETERSON & JOHNSON[6] は Celite 545を用い，固定層として水又は硫酸，展開剤として benzene, butanol-chloroform を用い formic a. から butyric a. にいたるまでの酸を分離定量した．そしてその reeoveries は formic a. 89%, aeetic a. 115.5%, propionic a. 97.3% n-butyric a. 98.2%であつたと報じている．著者等は silica gel を用い，夫々の酸に適合する展開剤を使用することにより V. F. As の分離定量を達成し得たのでこゝに報告する．

II 実　験

1.　Silica gel の調製．

2～3の市販品を塩酸処理して精製しこれを使用して見たが，いづれも成績が思わしくなかつたの

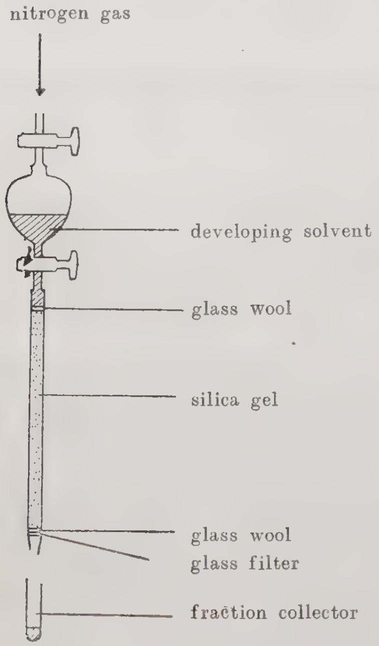
で次の方法で自製した．即ち，市販の水ガラスを少量の methyl orange を含む2倍容の蒸溜水で稀め，激しく攪拌しながら 10N HCl を滴下する．この間 silica gel の大きな塊が出来た時はガラス棒でくだく．液の pH がおゝむね2になつたならば HCl の滴下を中止し2〜3時間ゆるやかに攪拌を続け，次でこれを大型の BUCHNER のロートで吸引濾過し繰りかえし蒸溜水で洗う．水洗が終つたならばこれを N/5 HCl に48時間懸濁させ，次で再び BUCHNER のロートで吸引濾過し Cl' が完全に消失するまで水洗した後，これを200°Cで48時間乾燥し篩にかけて50〜100 mesh のものを集めてデシケィター中に保存する．

2. 展開溶剤及び column の充填．

(1) 展開溶剤：developing solvents としては benzene, butanol, chloroform toluene を試みた．これらはすべて chemical pure であり，benzene は H_2SO_4 に色が移行しなくなるまで濃H_2SO_4 と共に繰りかえし振り，次でこれを蒸溜水と共に再三振つて H_2SO_4 を除いたものを使用した．

(2) Column の充填：Column は内径 8 mm, 長さ30cm, 底部に glass filter を附したガラス管（三田村製）を使用した．その構造は Fig. 1の如くである．

Fig. 1. Diagram of column.



Column のつめ込みは，silica gel 9gm をとり，攪拌しながら水6.5ccを除々に加え，充分混和した後，更に benzene 30cc を加え，再びよく混和する．この silica gel と benzene の混和物を，予め底部に少量の glass wool をつめ込んだ column 用のガラス管に均一且つ緻密に充填する．この様にして製した column は，一度使用したものでも benzene で洗えば数回は使用出来るので，使用しない時は column の両端にゴム栓を施して silica gel が乾燥しないようにして保存した．

(3) 実験の実施：Column を用うる chromatography では吸着剤に保持させた固定層と developing solvents に対する sample の分配係数によつて流出の態度が決定するから，ある酸に対してはその酸に最も適合した developing sol. がある訳である．そこで下に述べる様な実験を行つて developing sol. の種類とその組成を選定した．

これからの実験はすべて室温（30〜34°C）下で行つたものであるが sample 中に含ませた酸は，水にとかした formic a., acetic a., propionic a., 及び butanol に溶した butyric a. である．実施に際しては，これらの酸の一定量を少量の silica gel に吸着させて少量の benzene と共に column の上部に流し込み，ガラス棒でよく押しつけてからその上を glass wool で被つた．これを fraction collecter に装着して developing sol. で展開し80滴（約2.5cc）づつの fraction として試験管にとり，各 fraction は phenolphthalein を indicator とし methanol 性 N/200 NaOH で滴定して酸度を知つた，なお，column の上端はNボンベに連接して圧力を加減することより developing sol. の滴出速度を規正した．

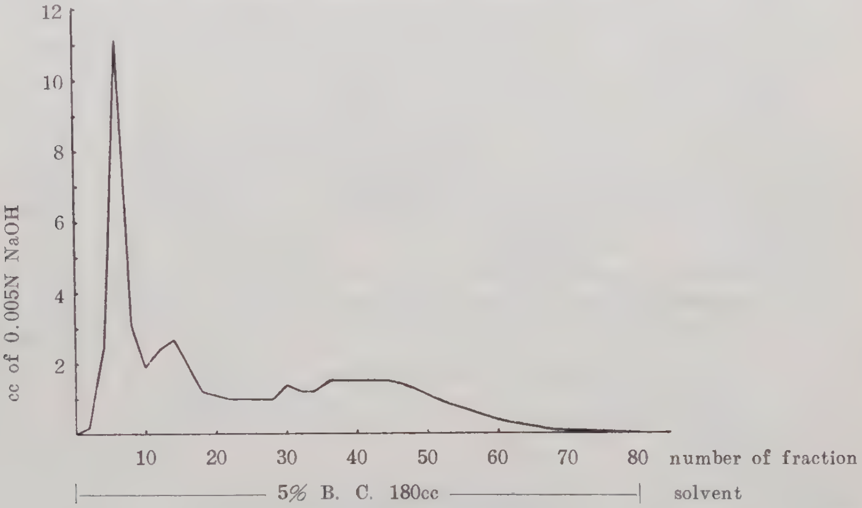
実 験 1

Sample 中の V. F. As. の種類及びその量：Acetic a. 5.0 mg, propionic a. 5.5 mg, butyric acid 9.6 mg.

Developing sol. : 5% butanol-chloroform（以下 B. C. と略記する）180cc

結果 Fig. 2の如くであつて各酸は極めて速に流出し殆ど分離しない。

Fig. 2. Developing behaviour of butyric, propionic and acetic acid with 5% butanol chloroform as developing solvent.



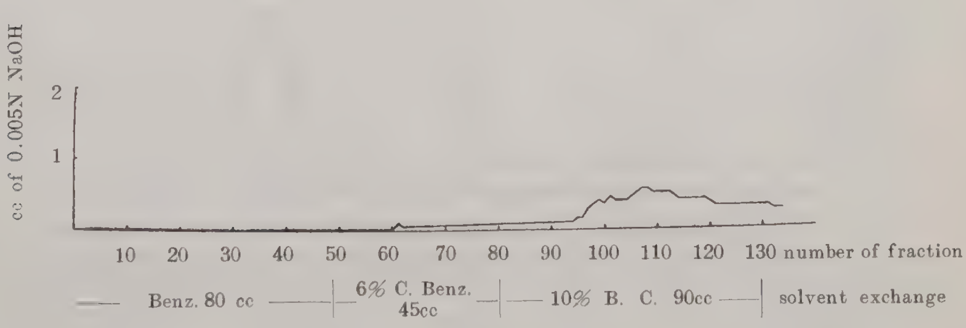
実 験 2

Sample 中の V. F. As の種類及びその量： Acetic a. 5.0mg, propionic a. 5.4mg, butyric 4.8mg.

Developing sol. : benzene 80cc, 6% chloroform-benzene, 10% B. C. 90cc.

結果 Fig 3 の如く，溶出がおそすぎて各酸の分離は困難であつた．

Fig. 3. Developing behaviour of butyric, propionic and acetic acid with benzene, 6% butanol benzene, 10% butanol chloroform as developing solvents.



実 験 3

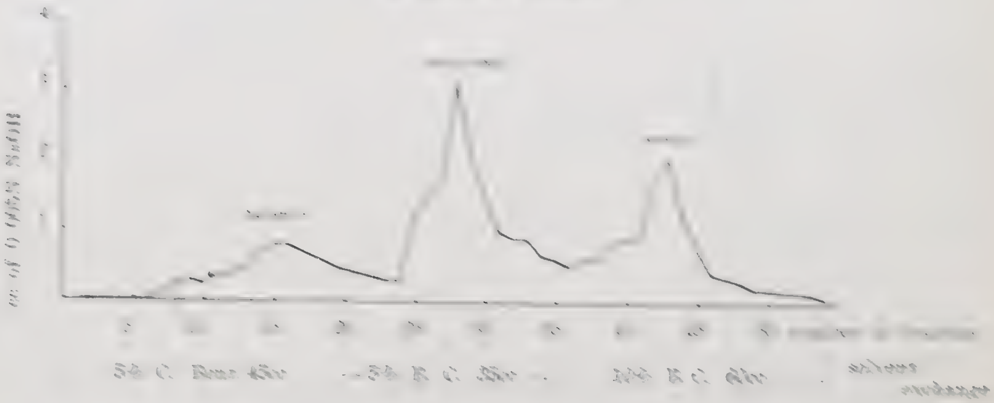
Sample 中の V. F. As. の種類及びその量 Acetic a. 5.0mg, propionic a. 5.4mg, butyric a.

4. Sum

Developing sol. : 3% chloroform benzene 45cc 5% B.C. 35cc 15% B.C. 60cc

[illegible] Fig. [illegible] benzene [illegible] [illegible] [illegible] [illegible] B.C.
[illegible]

Fig. [illegible] Developing behaviour of butyric, propionic and acetic acid with 3% chloroform-benzene, 5% butanol chloroform and 15% butanol chloroform as developing solvents.



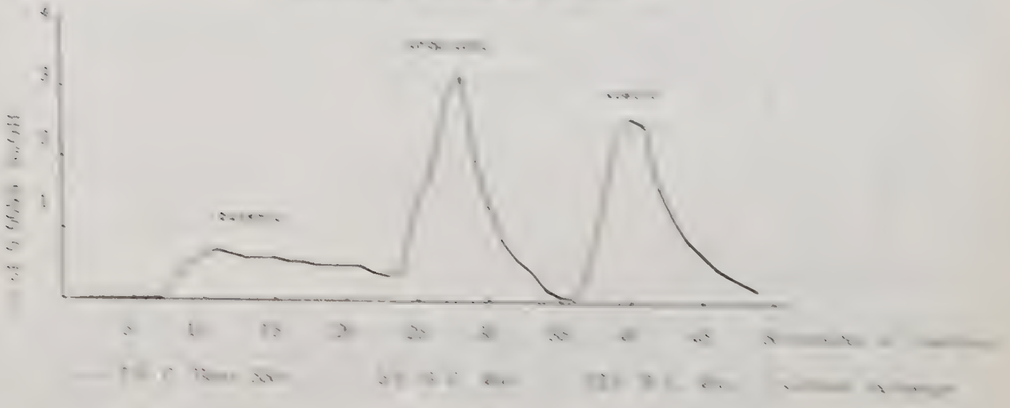
実 験 6

Sample [illegible] V. F. A. [illegible]

Developing sol. [illegible] chloroform benzene 35cc [illegible] B.C. 45cc 15% B.C. 60cc

[illegible] Fig. [illegible] acetic acid [illegible]

Fig. [illegible] Developing behaviour of butyric, propionic and acetic acid with 3% chloroform-benzene, 5% butanol chloroform and 15% butanol chloroform as developing solvents.



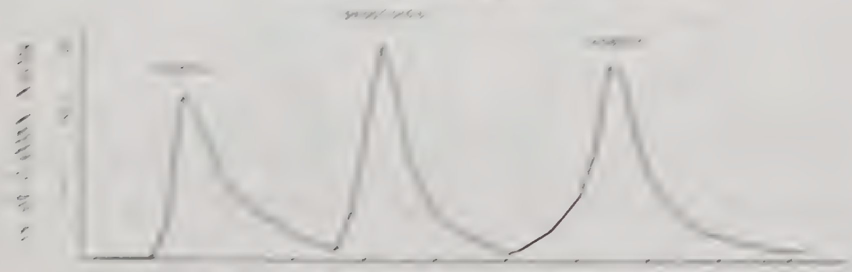
実 験 7

Sample [illegible] V. F. A. [illegible]

Developing sol. [illegible] benzene [illegible] B.C. [illegible] 15% B.C. [illegible]

結果 Fig. 6 [illegible] 101%, [illegible] %。

Fig. 6 [illegible] 1% [illegible] 3% [illegible] 12% [illegible]



1% [illegible] 3% [illegible] 12% [illegible]

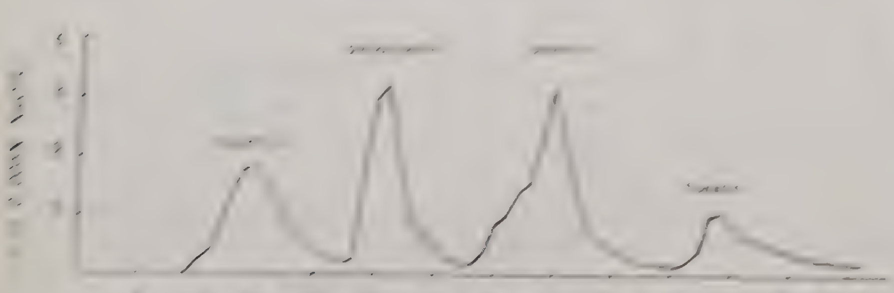
[illegible]

[illegible]

[illegible] 3% [illegible] 12% [illegible] 25% [illegible]

結果 Fig. 7 [illegible] 102.3% [illegible] 102 [illegible] %, [illegible] %, [illegible] %)

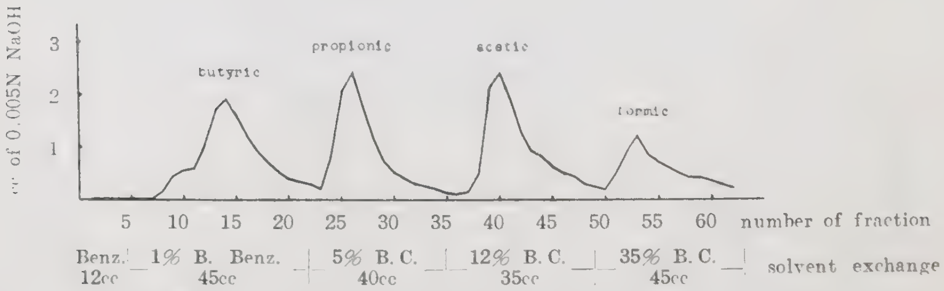
Fig. 7 [illegible] 1% [illegible] 3% [illegible] 25% [illegible]



[illegible] 1% [illegible] 3% [illegible] 12% [illegible] 25% [illegible]

[illegible]

Fig 8. Developing behaviour of butyric, propionic, acetic and formic acid with benzene, 1% butanol benzene, 5% butanol chloroform, 12% butanol chloroform and 35% butanol chloroform as developing solvents.



実験 7

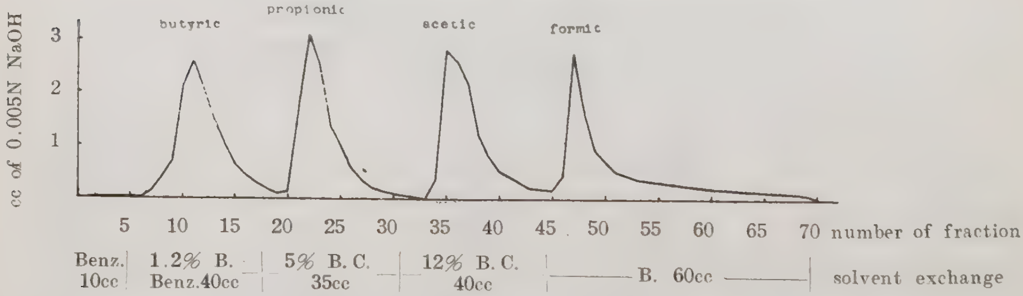
Sample 中の V. F. As. の種類及びその量： formic a. 2.8mg, acetic a. 3.7mg, propionic a. 4.6mg, butyric a. 5.4mg.

Developing sol. ： benzene 10cc, 1.2% butanol benzene 40cc, 5% B. C. 35cc, 12% B. C. 40cc, butanol 60cc.

結果： Fig. 9 の如くであつて，formic a. は butanol を展開することにより分離溶出することが出来ることを知つた.

本実験における各酸の recoveries は butyric a. 98%, propionic a. 94%, acetic a. 95%, formic a. 98%であつた.

Fig. 9. Developing behaviour of butyric, propionic, acetic and formic acid with benzene, 1.2% butanol benzene, 5% butanol chloroform, 12% butanol chloroform and butanol as developing solvents.



以上の如く V. F. As. 中の formic a. から butyric a. に至る酸は概ね正確に分離定量し得たので， valeric a. の分離定量の目的で次の実験を行つた.

実験 8

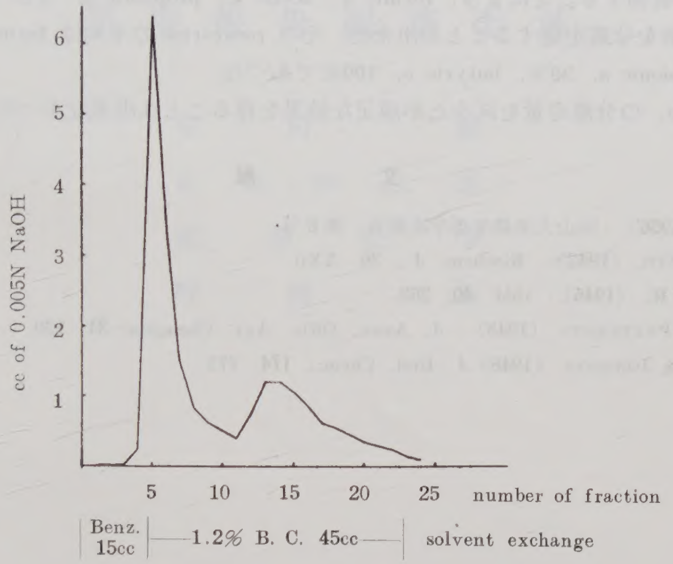
Sample 中の V. F. As. の種類及びその量： butyric a. 4.8mg, valeric a. 5.9mg.

Developing sol. ： benzene 15cc, 1.2% B. C. 45cc.

結果： Fig. 10の如く，valeric a. は119%の recovery を示し，しかも valeric a. が共存する

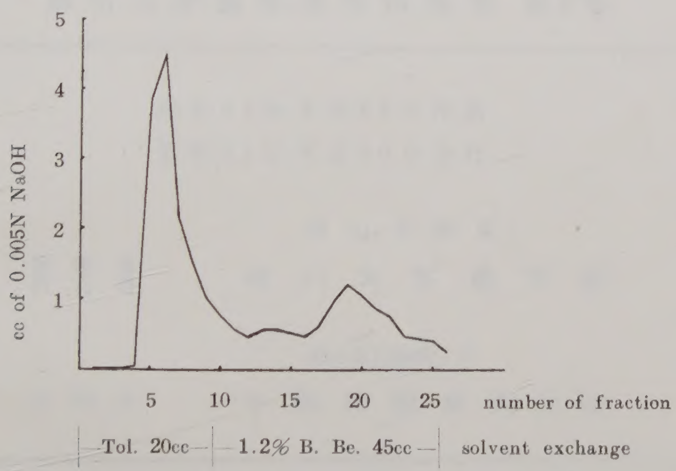
ために butyric a. の溶出位置に変化を来した.

Fig. 10. Developing behaviour of valeric and butyric acid with benzene and 1.2% butanol chloroform as developing solvents.



又，toluene が V. F. As. に対し benzene より小さい分配係数をもつことに着目し benzene の代りに toluene を流して見たが，その結果は Fig. 11の如く，valeric a. の recovery は127%を示し満足な結果は得られなかつた.

Fig. 11. Developing behaviour of valeric and butyric acid with toluene and 1.2% butanol chloroform as developing solvents.



Ⅲ 総　括

以上を総括すれば次の如くである.

1. 市販の silica gel は HCl 処理等の精製法を講じても column 分配 chromatography 用と

しては適当でなかつた．それでこの実験では，silica gel は水ガラスから造製して使用した．

2. 吸着剤としては自製の silica gel を，固定層としては水を使用した．

Benzene, 1.2% butanol benzene, 5% butanol chloroform, 12% butanol chloroform 及び butanol を逐次展開することにより，formic a., acetic a., propionic a. 及び butyric a. の混合 sample から各酸を分離定量することが出来た．その reeoveries の平均は formic a. 104%, acetic a. 101%, propionic a. 99%, butyric a. 100%であつた．

3. Valeric a. の分離定量を試みたが満足な結果を得ることは出来なかつた．

文　　献

1) 堀，田辺 (1956)：岡山大学農学部学術報告，第8号．

2) LESTER-SMITH, (1942)：Biochem. J., 36, XXii

3) ELSDEN, S. R., (1946)：ibid. 40, 252.

4) RAMSEY & PATTERSON, (1948)：J. Assoc. Offic. Agr. Chemists, 31, 139,

5) PETERSON & JOHNSON, (1948) J. Biol. Chem., 174, 775.

学術報告編集委員

安田　　勲
小松伊三郎
池田長守
畔柳　　鎮

岡山大学農学部学術報告　第9号

昭和31年9月25日印刷
昭和31年9月30日発行

編輯兼発行者　岡山市津島
岡山大学農学部

印刷所　岡山市天瀬30ノ2
中国印刷株式会社